

PCT/JP 99/01191

5 11.03.99

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 30 APR 1999

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1 9 9 9 年 2 月 3 日

出 願 番 号

Application Number:

平成 1 1 年特許願第 0 2 6 7 7 4 号

出 願 人

Applicant (s):

山之内製薬株式会社

PRIORITY

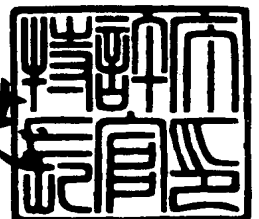
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1 9 9 9 年 4 月 1 6 日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山内 佐平



出証番号 出証特平 1 1 - 3 0 2 2 9 9 4

【書類名】	特許願
【整理番号】	0000002858
【提出日】	平成11年 2月 3日
【あて先】	特許庁長官 殿
【国際特許分類】	C12N 15/00
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内
【氏名】	松本 光之
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内
【氏名】	杉本 貫
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内
【氏名】	高崎 淳
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内
【氏名】	蒲原 正純
【発明者】	
【住所又は居所】	茨城県つくば市御幸が丘 2 1 山之内製薬株式会社内
【氏名】	斉藤 哲
【発明者】	
【住所又は居所】	東京都板橋区蓮根 3 - 1 7 - 1 山之内製薬株式会社内
【氏名】	小林 正人
【特許出願人】	
【識別番号】	000006677
【氏名又は名称】	山之内製薬株式会社
【代表者】	小野田 正愛
【代理人】	
【識別番号】	100089200

【弁理士】

【氏名又は名称】 長井 省三

【電話番号】 03-5916-5530

【選任した代理人】

【識別番号】 100098501

【弁理士】

【氏名又は名称】 森田 拓

【電話番号】 03-5916-5528

【選任した代理人】

【識別番号】 100109357

【弁理士】

【氏名又は名称】 矢野 恵美子

【電話番号】 03-5916-5530

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005348

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 図面 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：2、4、または6記載のアミノ酸配列を有しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質。

【請求項2】 配列番号：2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質。

【請求項3】 請求項1乃至2記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子。

【請求項4】 請求項3記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項5】 請求項4記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項6】 請求項5記載の宿主細胞を用いる請求項1乃至2記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する分野】

本発明は、遺伝子工学の分野に属し、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする遺伝子、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法に関するものである。

【0002】

【従来技術】

三量体型GTP結合蛋白質の活性化を介して細胞内にシグナルを伝達する細胞膜レセプター群は「G蛋白質共役型レセプター」と総称されている。現在まで知られている全てのG蛋白質共役型レセプターはアミノ末端を細胞外、カルボキシル末端を細胞内とし、細胞膜を7回貫通する構造を共有するスーパーファミリーを形成していることから「7回膜貫通型レセプター」と総称される場合もある。G蛋白質共役型レセプターは様々な生理活性物質の情報を、三量体型GTP結合蛋白質の活性化、それにより引き起こされる細胞内セカンドメッセンジャーの変動を

介して細胞膜から細胞内へと伝達する。三量体型GTP結合蛋白質により制御される細胞内セカンドメッセンジャーは、アデニレートシクラーゼを介するcAMP、フォスホリパーゼCを介するCa⁺⁺などがよく知られているが、三量体型GTP結合蛋白質を介したチャネルの制御、リン酸化酵素の活性化など多くの細胞蛋白がその標的となっていることが最近明らかとなってきた (Gudermann, T. et al. (1997) *Annu. Rev. Neurosci.*, 20, 399-427)。G蛋白質共役型レセプターを介して情報を伝達する生理活性物質の中には、神経伝達物質、ホルモン、ケモカイン、脂質由来の情報伝達物質、2価イオン、プロテアーゼなど既存の生理活性物質の多くが含まれる。これら生理活性物質にはそれぞれ特異的なG蛋白質共役型レセプターが存在し、その情報を伝達する。

【0003】

現在までに数百種類のG蛋白質共役型レセプターが真核生物からクローニングされている。ヒトに関しては百種類以上の内在性リガンドとの対応がとれたG蛋白質共役型レセプターがクローニングされており、これらの多くが疾患に対する薬剤の標的となっている。G蛋白質共役型レセプターが標的となっている疾患は多岐にわたり、中枢神経系、循環器系、炎症免疫系、消化器系、運動器系、泌尿器生殖器系それぞれの分野でG蛋白質共役型レセプターに作用する有効な薬剤が存在する (Stadel, J. et al. (1997) *Trends Pharmacol. Sci.*, 18 430-437)。このことはG蛋白質共役型レセプターのアゴニスト或いはアンタゴニストが疾患の治療剤となる可能性が高いことを示唆し、そのため新たなG蛋白質共役型レセプターの発見、同定のための研究が盛んに行われている。

【0004】

G蛋白質共役型レセプターはそのスーパーファミリー内での構造類似性から遺伝子のクローニングが先行する場合も多く、内在性リガンドとの対応がとれていないレセプターはオーファンG蛋白質共役型レセプターと呼ばれている。一般的にオーファンG蛋白質共役型レセプターには特異的なリガンドが存在しないため、そのアゴニスト、アンタゴニストを開発することは困難であった。しかし、近年、充実された化合物ライブラリーと高性能ハイスループットスクリーニングと

組み合わせることで、オーファンG蛋白質共役型レセプターをターゲットとした薬剤の創製が提唱されている (Stadel, J. et al. (1997) Trends Pharmacol. Sci., 18 430-437)。すなわち、多くのG蛋白質共役型レセプターのセカンドメッセンジャーとなっているcAMP、 Ca^{++} の測定、或いは、三量体型GTP結合蛋白質の活性化の指標となるGTPase活性、GTP γ SのG蛋白質結合測定をハイスループット化することで化合物ライブラリーからオーファンG蛋白質共役型レセプターに対するアゴニストをスクリーニングすることが可能であり、その化合物を利用した特異的なアゴニスト及びアンタゴニストの発見、ひいては特定の疾患治療薬の開発が可能であるということである。このような状況下では、新しい疾患の治療ターゲットとなり得る新規G蛋白質共役型レセプターの発見が、G蛋白質共役型レセプターに作用する薬剤創製の最も重要なステップと見なすことができる。

【0005】

G蛋白質共役型レセプターでは、一つの内在性リガンドに対して複数のレセプターが存在する場合がある。このようなレセプター群はレセプターファミリーとよばれ、各々のレセプターはサブタイプと称される。全てのG蛋白質共役型レセプターは細胞膜を7回貫通する構造を共有するため、互いに独立したG蛋白質共役型レセプターでも膜貫通領域を中心に20-25%のアミノ酸が保存されているが、レセプターファミリーを形成している場合にはそのサブタイプ間で保存されているアミノ酸の割合が35%以上、特に関連が高いサブタイプ間では60-80%と有意に上昇する (Strader, C.D., et al. (1994) Annu. Rev. Biochem., 63, 101-132)。レセプターファミリーが存在する内在性リガンドをターゲットとした疾患治療薬の開発を考える際には、サブタイプの特異性が重要となる場合が多い。通常、薬剤の主作用を介するサブタイプへの作用に対して、他のサブタイプへの作用は副作用につながるが多いためである。このためサブタイプ特異的なアゴニスト、或いはアンタゴニストの創製が望まれるが、そのためにはサブタイプの特異性を検出する手段が必要である。現在ではサブタイプの遺伝子をクローニングし、それを発現させた培養細胞系などを用いて特異性を検出する系を構築するという方法が一般的であ

る。

【0006】

新規なG蛋白質共役型レセプターを疾患治療のターゲットとする場合にもサブタイプ特異性が重要である可能性は高く、このため新規G蛋白質共役型レセプターでもレセプターファミリーの発見は重要である。独立したG蛋白質共役型レセプター間ではアミノ酸配列のホモロジーは全体で20-25%であるが、レセプターファミリーを形成している場合、ファミリー内では通常ホモロジーが有意に上昇することから、二者のG蛋白質共役型レセプターのホモロジーを比較することで、それらがファミリーを形成しているかどうか推定することが可能である。これを利用することでファミリーを形成している新規G蛋白質共役型レセプターの発見も可能であり、新規G蛋白質共役型レセプターファミリーが発見された場合は、サブタイプ特異的なアゴニスト及びアンタゴニストの創製が可能なことから疾患治療薬への道が更に拓けるものと考えられる。

【0007】

中枢神経系は神経伝達物質に代表される生理活性物質を用いて様々な情報を伝達、制御している。その情報伝達の際にG蛋白質共役型レセプターが重要な役割を果たしており、また多くの種類のG蛋白質共役型レセプターが中枢神経系に存在していることが知られている。これらの多くが中枢神経系の疾患の治療ターゲットとなっている。例えば、神経伝達物質ドーパミンのG蛋白質共役型レセプターは精神分裂病 (Seeman, P. et al. (1997) Neuropsychopharmacology, 16 93-110)、セロトニンのG蛋白質共役型レセプターは鬱病 (Cowen, P. J. (1991) Br. J. Psychiatry, 159 (Suppl. 12) 7-14)、ニューロペプチドYのG蛋白質共役型レセプターは摂食障害 (Blomqvist, A. G. and Herzog, H. (1997) Trends Neurosci., 20 294-298) の治療ターゲットであると考えられている。このことから、中枢神経系で発現している新規なG蛋白質共役型レセプターは新たな中枢神経系の疾患の治療ターゲットの候補になると考えられる。また、サブタイプ特異的な薬剤を開発するためには中枢神経系で発現している新規なG蛋白質共役型レセプターでもファミリーを発見すること

が望ましい。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、中枢神経系に発現している新規G蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質を中枢性疾患の治療薬剤の標的として提供することを課題とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、中枢神経系に発現している新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質ファミリーをコードする遺伝子（SREB1、SREB2、SREB3、rSREB1、rSREB2、rSREB3）を単離することに成功した。また、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該宿主細胞を用いた同G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造法を確立、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質及び該G蛋白質共役型レセプター蛋白質活性を修飾する化合物およびペプチドのスクリーニングを可能とした。

【0010】

具体的には本発明は、

(1) 配列番号：2、4、または6記載のアミノ酸配列を有しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、該蛋白質の同効物であるG蛋白質共役型レセプター蛋白質、

(2) 配列番号：2、4、6、22、または26記載のアミノ酸配列を有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質、

(3) (1)乃至(2)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子、

(4) (3)記載の遺伝子を含むベクター、

(5) (4)記載のベクターを含む宿主細胞、または

(6) (5)記載の宿主細胞を用いる(1)乃至(2)記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法、
に関する。

【0011】

【発明の実施の形態】

以下、本発明で使用される用語に付き説明する。

「ヒト由来」または「ラット由来」とは、ヒトまたはラットで発現している G 蛋白質共役型レセプター蛋白質と同一のアミノ酸配列であることをいう。

本発明の G 蛋白質共役型レセプター蛋白質の「同効物」とは、配列番号：2、4、あるいは 6 記載のアミノ酸配列で示される G 蛋白質共役型レセプター蛋白質のいずれかと同一の活性を示す、中枢神経系に発現しているヒト由来 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をいう。

なお、G 蛋白質共役型レセプターと G 蛋白質共役型レセプター蛋白質は、同義である。

【0012】

本発明の新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質は、配列番号：2、4、または 6 記載のアミノ酸配列で示される G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、それらの同効物なら何れでもよい。具体的には配列番号：2、4、または 6 記載のアミノ酸配列、あるいは、配列番号：2、4、または 6 記載のアミノ酸配列において 1 もしくは複数個のアミノ酸でアミノ酸の置換、欠失または挿入があるアミノ酸配列を有し、かつ、配列番号：2、4、または 6 記載のアミノ酸配列で示される蛋白質と同一の活性を有する G 蛋白質共役型レセプター蛋白質であれば本発明に包含される。好ましくは、ヒト由来又はラット由来の配列番号：2、4、6、22、または 26 記載のアミノ酸配列を有する G 蛋白質共役型レセプター蛋白質である。

【0013】

また、本発明の新規 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子は、配列番号：2、4、または 6 記載のアミノ酸配列で示される G 蛋白質共役型レセプター蛋白質、あるいは、それらの同効物をコードする塩基配列を有する遺伝子なら何れでもよい。好ましくは、配列番号：2、4、6、22、または 26 記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子である。さらに好ましくは、配列番号：1 記載の塩基配列の 1 番目から 1125 番目、配列番号：3 記載の塩基配列の 1 番目から 1110 番目、配列番号：5 記載の塩基

配列の1番目から1119番目、配列番号：21記載の塩基配列の1番から1131番目、配列番号：23記載の塩基配列の1番目から1110番目、又は配列番号：25記載の1番目から1119番目を有する遺伝子である。

【0014】

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする遺伝子は、以下の方法によって得ることができる。

1) 新規G蛋白質共役型レセプター遺伝子の製造方法

a) 第1製造法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を産生する能力を有するヒト細胞あるいは組織からmRNAを抽出する。次いでこのmRNAを鋳型として該G蛋白質共役型レセプター蛋白質mRNAまたは一部のmRNA領域をはさんだ2種類のプライマーを用いる。逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（以下RT-PCRという）を行うことにより、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNAまたはその一部を得ることができる。さらに、得られたG蛋白質共役型レセプターcDNAまたはその一部を適当な発現ベクターに組み込むことにより、宿主細胞で発現させ、該レセプター蛋白質を製造することができる。

【0015】

まず、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の産生能力を有する細胞あるいは組織、例えばヒト脳またはラット脳から該蛋白質をコードするものを包含するmRNAを既知の方法により抽出する。抽出法としては、グアニジン・チオシアネート・ホット・フェノール法、グアニジン・チオシアネート-グアニジン・塩酸法等が挙げられるが、好ましくはグアニジン・チオシアネート塩化セシウム法が挙げられる。該蛋白質の産生能力を有する細胞あるいは組織は、該蛋白質をコードする塩基配列を有する遺伝子あるいはその一部を用いたノーザンブロットティング法、該蛋白質に特異的な抗体を用いたウエスタンブロットティング法などにより特定することができる。

mRNAの精製は常法に従えばよく、例えばmRNAをオリゴ(dT)セルロースカラムに吸着・溶出させ、精製することができる。さらに、ショ糖密度勾配遠心法等によりmRNAをさらに分画することもできる。

また、mRNAを抽出せずとも、市販されている抽出済mRNAを用いても良い。

次に、精製されたmRNAをランダムプライマー又はオリゴdTプライマーの存在下で、逆転写酵素反応を行い第1鎖cDNAを合成する。この合成は常法によって行うことができる。得られた第1鎖cDNAを用い、目的遺伝子の一部の領域をはさんだ2種類のプライマーを用いてPCRに供し、目的とする新規G蛋白質共役型レセプターDNAを増幅する。得られたDNAをアガロースゲル電気泳動等により分画する。所望により、上記DNAを制限酵素等で切断し、接続することによって目的とするDNA断片を得ることもできる。

【0016】

b) 第2製造法

本発明の遺伝子は上述の製造法その他、常法の遺伝子工学的手法を用いて製造することもできる。まず、前述の方法で得たmRNAを鋳型として逆転写酵素を用いて1本鎖cDNAを合成した後、この1本鎖cDNAから2本鎖cDNAを合成する。その方法としてはS1ヌクレアーゼ法 (Efstratiadis, A. et al. (1976) Cell, 7, 279-288)、Land法 (Land, H. et al. (1981) Nucleic Acids Res., 9, 2251-2266)、O. Joon Yoo法 (Yoo, O. J. et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1049-1053)、Okayama-Berg法 (Okayama, H. and Berg, P. (1982) Mol. Cell. Biol., 2, 161-170)などが挙げられる。

【0017】

次に、上述の方法で得られる組換えプラスミドを大腸菌、例えばDH5 α 株に導入して形質転換させて、テトラサイクリン耐性あるいはアンピシリン耐性を指標として組換え体を選択することができる。宿主細胞の形質転換は、例えば、宿主細胞が大腸菌の場合にはHanahanの方法 (Hanahan, D. (1983) J. Mol. Biol., 166, 557-580)、すなわちCaCl₂やMgCl₂またはRbClを共存させて調製したコンピテント細胞に該組換えDNA体を加える方法により実施することができる。なお、ベクターとしてはプラスミド以外にもラムダ系などのファージベクターも用いることができる。

【0018】

上記により得られる形質転換株から、目的の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質のDNAを有する株を選択する方法としては、例えば以下に示す各種方法を採用できる。

① 合成オリゴヌクレオチドプローブを用いるスクリーニング法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の全部または一部に対応するオリゴヌクレオチドを合成し（この場合コドン使用頻度を用いて導いたヌクレオチド配列または考えられるヌクレオチド配列を組合せた複数個のヌクレオチド配列のどちらでもよく、また後者の場合、イノシンを含ませてその種類を減らすこともできる）、これをプローブ（ ^{32}P 又は ^{33}P で標識する）として、形質転換株のDNAを変性固定したニトロセルロースフィルターとハイブリダイズさせ、得られたポジティブ株を検索して、これを選択する。

② ポリメラーゼ連鎖反応により作製したプローブを用いるスクリーニング法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の一部に対応するセンスプライマーとアンチセンスプライマーのオリゴヌクレオチドを合成し、これらを組合せてポリメラーゼ連鎖反応(Saiki, R. k. et al. (1988) Science 239, 487-491)を行い、目的のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の全部又は一部をコードするDNA断片を増幅する。ここで用いる鋳型DNAとしては、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を産生する細胞のmRNAより逆転写反応にて合成したcDNA、またはゲノムDNAを用いることができる。このようにして調製したDNAを断片を ^{32}P 又は ^{33}P で標識し、これをプローブとして用いてコロニーハイブリダイゼーションまたはブランクハイブリダイゼーションを行うことにより目的のクローンを選択する。

【0019】

③ 他の動物細胞で新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質を産生させてスクリーニングする方法

形質転換株を培養し、遺伝子を増幅させ、その遺伝子を動物細胞にトランスフェクトし（この場合、自己複製可能で転写プロモーター領域を含むプラスミドもしくは動物細胞の染色体に組み込まれ得るようなプラスミドのいずれでもよい）、遺伝子にコードされた蛋白を細胞表面に産生させる。本発明のG蛋白質共役型

レセプター蛋白質に対する抗体を用いて該蛋白質を検出することにより、元の形質転換株より目的のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを有する株を選択する。

④ 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体を用いて選択する方法

あらかじめ、cDNAを発現ベクターに組み込み、形質転換株表面で蛋白を産生させ、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体および該抗体に対する2次抗体を用いて、所望のG蛋白質共役型レセプター蛋白質産生株を検出し、目的の株を選択する。

⑤ セレクティブ・ハイブリダイゼーション・トランスレーションの系を用いる方法

形質転換株から得られるcDNAを、ニトロセルロースフィルター等にプロットし本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質産生細胞からのmRNAをハイブリダイズさせた後、cDNAに結合したmRNAを解離させ、回収する。回収されたmRNAを蛋白翻訳系、例えばアフリカツメガエルの卵母細胞への注入や、ウサギ網状赤血球ライゼートや小麦胚芽等の無細胞系で蛋白に翻訳させる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体を用いて検出して、目的の株を選択する。

得られた目的の形質転換株より本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを採取する方法は、公知の方法(Maniatis, T. et al.(1982): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY)に従い実施できる。例えば細胞よりプラスミドDNAに相当する画分を分離し、該プラスミドDNAよりcDNA領域を切り出すことにより行ない得る。

【0020】

c) 第3製造法

配列番号：2、4、6、22、または26で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子は、化学合成法によって製造したDNA断片を結合することによっても製造できる。各DNAは、DNA合成機（例えば、Oligo 1000M DNA Synthesizer(Beckman社)、あるいは、394 DNA/RNA Synthesizer

(Applied Biosystems社)など)を用いて合成することができる。

【0021】

d) 第4製造法

本発明の遺伝子を利用して遺伝子工学的手法により得られる物質が本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質機能を発現するためには、必ずしも配列表 配列番号: 2、4、6、22、または26に示されるアミノ酸配列のすべてを有するものである必要は無く、例えばその一部の配列であっても、あるいは他のアミノ酸配列が付加されていても、それが配列番号: 2、4、6、22、または26に示されるアミノ酸配列で示されるG蛋白質共役型レセプター蛋白質と同一の活性を示す限り、それらの蛋白質もまた本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に包含される。また、一般に真核生物の遺伝子はインターフェロン遺伝子等で知られているように、多型現象(polymorphism)を示すと考えられ(例えば、Nishi, T. et al. (1985) J. Biochem., 97, 153-159を参照)、この多型現象によって1または複数個のアミノ酸が置換される場合もあれば、ヌクレオチド配列の変化はあってもアミノ酸は全く変わらない場合もある。したがって、配列番号: 2、4、または6で示されるアミノ酸配列の中の1もしくは複数個の部位において、1もしくは複数個のアミノ酸残基が置換、失欠、または挿入されている蛋白質でも配列番号: 2、4、または6記載のアミノ酸配列で示されるG蛋白質共役型レセプターと同一の活性を有していることがありえる。これらの蛋白質は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の同効物と呼び、本発明に含まれる。また、配列番号: 22、24、または26で示されるラット由来アミノ酸配列を有するG蛋白質共役型レセプター、または当該レセプターと同一の活性を有しているG蛋白質共役型レセプターも同効物に包含される。

【0022】

これらの本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の同効物をコードする塩基配列を有する遺伝子はすべて本発明に含まれる。このような各種の本発明の遺伝子は、上記本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の情報に基づいて、例えばホスファイト・トリエステル法(Hunkapiller, M. et al. (1984) Nature, 10, 105-111)等の常法に従い、核酸の化学合成により

製造することもできる。なお、所望アミノ酸に対するコドンはそれ自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる(Crantham,

R. et al.(1981) Nucleic Acids Res.,9 r43-r74)。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用したサイトスペシフィック・ミュータジェネシス(site

specific mutagenesis)(Mark, D. F. et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5662-5666)等に従うことができる。

【0023】

以上、a)乃至d)により得られるDNAの配列決定は、例えばマキシムーギルバートの化学修飾法(Maxam,

A. M. and Gilbert, W. (1980): "Methods in Enzymology"65, 499-559)やM13を用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法(Messing, J. and Vieira, J (1982) Gene, 19, 269-276)等により行うことができる。

また、本発明のベクター、本発明の宿主細胞、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、下記の方法によって得ることができる。

2) 本発明のG蛋白質共役型レセプターの組み換え蛋白質の製造方法

単離された本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする遺伝子を含む断片は、適当なベクターDNAに再び組込むことにより、他の真核生物の宿主細胞を形質転換させることができる。さらに、これらのベクターに適当なプロモーターおよび形質発現にかかわる配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現させることが可能である。

真核生物の宿主細胞には、脊椎動物、昆虫、酵母等の細胞が含まれ、脊椎動物細胞としては、例えばサルの細胞であるCOS細胞(Gluzman, Y. (1981) Cell, 23, 175-182)やチャイニーズ・ハムスター卵巣細胞(CHO)のジヒドロ葉酸レダクターゼ欠損株 (Urlaub, G. and Chasin, L. A. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220)、ヒト胎児腎臓由来HEK293細胞および同細胞にEpstein

Barr VirusのEBNA-1遺伝子を導入した293-EBNA細胞 (Invitrogen社) 等がよく用いられているが、これらに限定されるわけではない。

脊椎動物細胞の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子の上流に位置するプロモーター、RNAのスプライス部位、ポリアデニル化部位および転写終結配列等を有するものを使用でき、これはさらに必要により複製起点を有してもよい。該発現ベクターの例としては、SV40の初期プロモーターを有するpSV2dhfr

(Subramani, S. et al. (1981) Mol. Cell. Biol., 1, 854-864)、ヒトのelongation

factorプロモーターを有するpEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S.

(1990) Nucleic Acids Res., 18, 5322)、cytomegalovirusプロモーターを有するpCEP4(Invitrogen社) 等を例示できるが、これに限定されない。

【0024】

宿主細胞として、COS細胞を用いる場合を例に挙げると、発現ベクターとしては、SV40複製起点を有し、COS細胞において自律増殖が可能であり、さらに転写プロモーター、転写終結シグナルおよびRNAスプライス部位を備えたものを用いることができ、例えば、

pME18S、(Maruyama, K. and Takebe, Y. (1990) Med. Immunol., 20,

27-32)、pEF-BOS (Mizushima, S. and Nagata, S. (1990) Nucleic Acids

Res., 18, 5322)、pCDM8(Seed, B. (1987) Nature, 329, 840-842) 等が挙げら

れる。該発現ベクターはDEAE-デキストラン法(Luthman,

H. and Magnusson, G. (1983) Nucleic Acids Res., 11, 1295-1308)、リン酸カル

シウム-DNA共沈殿法(Graham,

F. L. and van der Ed, A. J. (1973) Virology, 52, 456-457)、FuGENE6(Boeri

nger

Mannheim社) を用いた方法、および電気パルス穿孔法(Neumann, E. et

al. (1982) EMBO J., 1, 841-845) 等によりCOS細胞に取り込ませることができ、

かくして所望の形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞としてCHO細胞

を用いる場合には、発現ベクターと共に、G418耐性マーカーとして機能するne

o遺伝子を発現し得るベクター、例えばpRSVneo(Sambrook, J. et al. (1989): "Molecular Cloning-A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory, NY)やpSV2-neo(Southern, P. J. and Berg, P. (1982) J. Mol. Appl. Genet., 1, 327-341)等をコ・トランスフェクトし、G418耐性のコロニーを選択することにより新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質を安定に産生する形質転換細胞を得ることができる。また、宿主細胞として293-EBNA細胞を用いる場合には、Epstein Barr Virusの複製起点を有し、293-EBNA細胞で自己増殖が可能なpCEP4(Invitrogen社)などの発現ベクターを用いて所望の形質転換細胞を得ることができる。

【0025】

上記で得られる所望の形質転換体は、常法に従い培養することができ、該培養により細胞内または細胞表面に本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質が生産される。該培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、例えば上記COS細胞であればRPMI-1640培地やダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地に必要に応じ牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したものを使用できる。また、上記293-EBNA細胞であれば牛胎児血清(FBS)等の血清成分を添加したダルベッコ修正イーグル最小必須培地(DMEM)等の培地にG418を加えたものを使用できる。

上記により、形質転換体の細胞内または細胞表面に生産される本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、該レセプター蛋白質の物理的性質や化学的性質等を利用した各種の公知の分離操作法により、それらより分離・精製することができる。該方法としては、具体的には例えばレセプター蛋白質を含む膜分画を可溶化した後、通常の蛋白沈殿剤による処理、限外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー(ゲル濾過)、吸着クロマトグラフィー、イオン交換体クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合せ等を例示できる。なお、膜分画は常法に従って得ることができる。例えば本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を表面に発現した細胞を培養し、これらをバッファーに懸濁後、ホモジナイズし遠心分離することにより得られる。また、できるだけ緩和な可溶化剤(CH

APS、

Triton X-100、ジキトニン等)でG蛋白質共役型レセプター蛋白質を可溶化することにより、可溶化後もレセプターの特性を保持することができる。

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質はマーカー配列とインフレーションで融合して発現させることで、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現の確認、細胞内局在の確認、精製等が可能になる。マーカー配列としては、例えば、FLAG epitope、Hexa-Histidine tag、Hemagglutinin tag、myc epitopeなどがある。

また、マーカー配列と該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の間にエンテロキナーゼ、ファクターXa、トロンピンなどのプロテアーゼが認識する特異的な配列を挿入することにより、マーカー配列部分をこれらのプロテアーゼにより切断除去する事が可能である。例えば、ムスカリンアセチルコリン受容体とHexa-Histidine tagとをトロンピン認識配列で連結した報告がある(林ら、J. Biochem.

vol. 120 p1232-1238 (1996))

【0026】

本発明にはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物およびペプチドのスクリーニング法が包含される。該スクリーニング法は、前記により構築されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質を用いて、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の生理学的な特性に応じたG蛋白質共役型レセプター蛋白質の修飾の指標を測定する系に被験薬を添加し、該指標を測定する手段を含む。該測定系は、具体的には、以下のスクリーニング方法が挙げられる。また、被験薬は従来G蛋白質共役型レセプターリガンド活性を有することは知られているが該新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性に対して選択的に修飾するか不明な化合物またはペプチド、あるいはケミカルファイルに登録されている種々のG蛋白質共役型レセプターリガンド活性については不明の公知化合物やペプチド、コンビナトリアル・ケミストリー技術(Terrett, N.K., et al. (1995) Tetrahedron, 51, 8135-8137)によって得られた化合物群やファージ・ディスプレイ法(Felici, F., et al. (1991) J. Mol. Biol., 222, 301-310)などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物

、海洋生物由来の天然成分、動物組織抽出物などもスクリーニングの対象となる。あるいは本発明のスクリーニング法により選択された化合物またはペプチドを化学的または生物学的に修飾した化合物またはペプチドを用いる。

【0027】

3) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合する化合物およびペプチド、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物およびペプチドのスクリーニング方法

a) リガンド結合アッセイ法を利用したスクリーニング方法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合する化合物およびペプチド（総称してリガンド）はリガンド結合アッセイ法によりスクリーニングする事ができる。該レセプター蛋白質を発現させた細胞膜、あるいは該レセプター蛋白質精製標品を調製し、リガンド結合アッセイ用に精製されたりガンドを放射性標識（50-2000

Ci/mmol）する。緩衝液、イオン、pHのようなアッセイ条件を最適化し、最適化したバッファー中で同レセプター蛋白質を発現させた細胞膜、あるいは該レセプター蛋白質精製標品を放射性標識したりガンドと共に一定時間インキュベーションする。反応後、ガラスフィルター等で濾過し適量のバッファーで洗浄した後、フィルターに残存する放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する（全結合量）。放射性標識していないリガンドを上記反応液中に大過剰加えることにより非特異的結合量を測定し、全結合量から非特異的結合量を差し引くことにより特異的結合量がえられる。該レセプター蛋白質を発現させた細胞膜、あるいは該レセプター蛋白質精製標品に対して特異的結合を示したりガンドを本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドとして選択することができる。また、得られた放射活性リガンドの結合阻害を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアゴニスト/アンタゴニストをスクリーニングすることができる。

【0028】

b) GTP γ S結合法を利用したスクリーニング方法

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物およびペプ

チドはGTP γ S結合法によりスクリーニングすることが可能である (Lazareno, S. and Birdsall, N.J.M. (1993) Br. J. Pharmacol. 109, 1120-1127)。該レセプター蛋白質を発現させた細胞膜を20

mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 50 mM GDP溶液中で、 ^{35}S で標識されたGTP γ S

400 pMと混合する。被検薬存在下と非存在下でインキュベーション後、ガラスフィルター等で濾過し、結合したGTP γ Sの放射活性を液体シンチレーションカウンター等で測定する。被検薬存在下における特異的なGTP γ S結合の上昇を指標に、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアゴニスト活性を有する化合物およびペプチドをスクリーニングすることができる。また、得られたアゴニスト活性を有する化合物およびペプチドによるGTP γ S結合上昇の抑制を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアンタゴニスト活性を有する化合物およびペプチドをスクリーニングすることができる。

【0029】

c) 細胞内 Ca^{++} およびcAMP濃度の変動を利用したスクリーニング方法

多くのG蛋白質共役型レセプター蛋白質はアゴニスト刺激で細胞内の Ca^{++} の上昇および／またはcAMP濃度の上昇または低下を引き起こす。ゆえに本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物およびペプチドは細胞内 Ca^{++} またはcAMP濃度の変動を利用してスクリーニングすることが可能である。 Ca^{++} 濃度の測定はfura2等を用い、cAMP濃度の測定は市販のcAMP測定キット(Amersham社等)を用いて測定する。また、 Ca^{++} およびcAMP濃度に依存して転写量が調節される遺伝子の転写活性を検出することにより間接的に Ca^{++} およびcAMP濃度を測定することが可能である。該レセプター蛋白質を発現させた細胞とレセプター蛋白質を発現させていない宿主細胞(コントロール細胞)に化合物、ペプチド、組織抽出物等を一定時間作用させ、 Ca^{++} およびcAMP濃度を直接あるいは間接的に測定する。コントロール細胞と比較して、該レセプター蛋白質を発現させた細胞特異的な Ca^{++} の上昇および／またはcAMP濃度の上昇または低下を指標にアゴニスト活性を有する化合物およびペプチドをスクリーニングすることができる。また、得られたアゴニスト活性を有する化合物およびペプチドによる Ca^{++} の上昇および／

またはcAMP濃度の上昇または低下を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアンタゴニスト活性を有する化合物およびペプチドをスクリーニングすることができる。

【0030】

d) マイクロフィジオメーターを用いたスクリーニング方法

細胞が様々なシグナル応答を行う場合、細胞外への微少な水素イオンの流出が検出される。この水素イオンの流出は、その大部分が、細胞が応答するためのエネルギーを得るための燃料消費で生ずる代謝産物の増加、または細胞のシグナルが直接水素イオンポンプに伝達する場合に生ずる。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、そのシグナル伝達にエネルギーを必要とするため、レセプターの活性化の際には水素イオンの流出が起こる。CYTOSENSORマイクロフィジオメーター (Molecular

Devices社) により、このような細胞近傍の培地中の微少な水素イオンの流出によるpH変化が検出可能であることから、このようなエネルギーを消費する受容体の活性化の検出に利用できる。該レセプター蛋白質を発現させた細胞とレセプター蛋白質を発現させていない宿主細胞 (コントロール細胞) に化合物、ペプチド、組織抽出物等を一定時間作用させ、水素イオンの流出によるpH変化を測定する。コントロール細胞と比較して、該レセプター蛋白質を発現させた細胞特異的な水素イオンの流出によるpH変化を指標にアゴニスト活性を有する化合物およびペプチドをスクリーニングすることができる。また、得られたアゴニスト活性を有する化合物およびペプチドによる水素イオンの流出によるpH変化を指標に該G蛋白質共役型レセプター蛋白質のアンタゴニスト活性を有する化合物およびペプチドをスクリーニングすることができる。

【0031】

本発明には、G蛋白質共役型レセプター蛋白質または前記スクリーニング法により選択されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を有意に修飾する化合物またはペプチドを有効成分とする医薬が包含される。

本発明医薬は、G蛋白質共役型レセプターの活性を選択的に制御する新規な薬理作用を有することを特徴としており、該医薬の用途としては該G蛋白質共役型

レセプター活性の亢進、低下、変性等の異常に起因するあるいは該異常を発現・併発する疾患である中枢性疾患などが挙げられる。

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質活性修飾化合物やペプチドを有効成分とする製剤は、該有効成分のタイプに応じて、それらの製剤化に通常用いられる担体や賦形剤、その他の添加剤を用いて調製されうる。

投与は錠剤、丸剤、カプセル剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、経口用液剤などによる経口投与、あるいは静注、筋注などの注射剤、坐剤、経皮投与剤、経粘膜投与剤などによる非経口投与が挙げられる。特に胃で消化されるペプチドにあっては静注等の非経口投与が望まれる。

本発明による経口投与のための固体組成物は、一つ又はそれ以上の活性物質が少なくとも一つの不活性な希釈剤、例えば乳糖、マンニトール、ブドウ糖、微結晶セルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合される。組成物は常法に従って、不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば滑沢剤、崩壊剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤などを含有していてもよい。錠剤や丸剤は必要により糖衣又は胃溶性若しくは腸溶性物質などのフィルムで被覆していてもよい。

【0032】

経口のための液体組成物は、乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤を含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールを含む。該組成物は不活性な希釈剤以外の添加剤、例えば湿潤剤、懸濁剤、甘味剤、芳香剤、防腐剤を含有していてもよい。

非経口のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤を含む。水溶性の溶液剤や懸濁剤には、希釈剤として例えば注射用蒸留水、生理用食塩水などが含まれる。非水溶性の溶液剤、懸濁剤の希釈剤としてはプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80等を含む。該組成物はさらに湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤、溶解乃至溶解補助剤、防腐剤などを含んでいてもよい。組成物は例えばバクテリア保留フィルターを通す濾過、殺菌剤の配合、または照射によって無菌化される。また、無菌の固体組成物を製造し、使

用に際し無菌水その他の無菌用注射用媒体に溶解し使用することもできる。

投与量は前記スクリーニング法により選択された有効成分の活性の強さ、症状、投与対象の年齢、性別等を考慮して適宜決定される。

【0033】

【実施例】

以下、本発明を更に具体的に開示するために、実施例を記載するが、本発明は実施例に限定されるものではない。なお、特に断りがない場合は、公知の方法（Maniatis,

T. et al. (1982) : "Molecular Cloning - A Laboratory Manual"

Cold Spring Harbor Laboratory, NY) に従って実施可能である。

【0034】

（実施例1）新規G蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質をコードする遺伝子の単離

本発明のG蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質（SREB1、SREB2、SREB3）をコードする全長cDNAは、ヒト脳由来のpoly A+ RNA（Clontech社）をtemplateとしてRT-PCRにより取得した。

新規G蛋白質共役型レセプターヒトSREB1の増幅にはforward primerとして5'-AAAATCTAGA

CGCGATGGCGAACGCGAGCGA-3'（配列番号：7）、reverse primerとして5'-AAAATCTAGA

GTCTATGTGGCGGGCCTCCC-3'（配列番号：8）を用いた（それぞれの5'末端にはXbaI

siteが付加してある）。RT-PCRはPfu DNA polymerase（Stratagene社）を用い5% formamide存在下で98℃（20秒）／64℃（30秒）／74℃（3分）のサイクルを34回繰り返した。その結果、約1.2

kbpのDNA断片が増幅された。この断片をXbaIで消化した後、pCEP4 plasmid（Invitrogen社）を用いてクローニングした。pCEP4

plasmidは、動物細胞において強力なプロモーター活性を示すCMVプロモーターを持っているので、動物細胞に組み換え蛋白質を発現させるのに使用できる。得ら

れたクローンの塩基配列はdideoxy

terminator法によりABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列表 配列番号: 1 に示す。

同配列は1125 baseのopen reading frame (配列番号: 1 の第1番目から第1125番目) を持っている。open

reading frameから予測されるアミノ酸配列 (375アミノ酸) を配列表 配列番号: 2 に示す。予想アミノ酸配列は、G蛋白質共役型レセプターの特徴である7個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子がG蛋白質共役型レセプターをコードすることが解った。

【0035】

新規G蛋白質共役型レセプターヒトSREB2の増幅にはforward primerとして5'-AAAATCTAGA

TCTATGGCGAACTATAGCCATGCA-3' (配列番号: 9)、reverse primerとして5'-AAAA TCTAGA

AAGGCTAAAGATTTACAGATGCTCC-3' (配列番号: 10) を用いた (それぞれの5'末端にはXbaI

siteが付加してある)。RT-PCRはPfu DNA polymerase (Stratagene社) を用い96℃ (20秒) / 54℃ (30秒) / 74℃ (3分) のサイクルを34回繰り返した。その結果、約1.2

kbpのDNA断片が増幅された。この断片をXbaIで消化した後、pCEP4 plasmid (Invitrogen社) を用いてクローニングした。

得られたクローンの塩基配列はdideoxy terminator法によりABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列表 配列番号: 3に示す。

同配列は1110 baseのopen reading frame (配列番号: 3 の第1番目から第1110番目) を持っている。open

reading frameから予測されるアミノ酸配列 (370アミノ酸) を配列表 配列番号: 4に示す。予想アミノ酸配列は、G蛋白質共役型レセプターの特徴である7個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子がG蛋白

質共役型レセプターをコードすることが解った。

【 0 0 3 6 】

新規 G 蛋白質共役型レセプターヒト SREB3 の増幅には forward primer として 5'-AAAATCTAGA

GTATGGCCAACACTACCGGAGAG-3' (配列番号 : 1 1) 、 reverse primer として 5'-AAAATCTAGA

CCTGTCTGCCTACCAGCCTGC-3' (配列番号 : 1 2) を用いた (それぞれの 5' 末端には XbaI

site が付加してある) 。 RT-PCR は Pfu DNA polymerase (Stratagene 社) を用い 5% formamide 存在下で 98℃ (20 秒) / 62℃ (30 秒) / 74℃ (3 分) のサイクルを 34 回繰り返した。その結果、約 1.2

kbp の DNA 断片が増幅された。この断片を XbaI で消化した後、pCEP4 plasmid (Invitrogen 社) を用いてクローニングした。

得られたクローンの塩基配列は dideoxy terminator 法により ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。明らかになった配列を配列表 配列番号 : 5 に示す。

同配列は 1119 base の open reading frame (配列番号 : 5 の第 1 番目から第 1119 番目) を持っている。 open

reading frame から予測される アミノ酸配列 (373 アミノ酸) を配列表 配列番号 : 6 に示す。予想アミノ酸配列は、G 蛋白質共役型レセプターの特徴である 7 個の膜貫通ドメインと思われる疎水性領域を有していることから、本遺伝子が G 蛋白質共役型レセプターをコードすることが解った。

新規 G 蛋白質共役型レセプター SREB ファミリー (SREB1、SREB2、SREB3) と既存の G 蛋白質共役型レセプターファミリーとのホモロジーはそれぞれアミノ酸配列で 25% 以下である。

一方、SREB1 と SREB2 のホモロジーは 52%、SREB1 と SREB3 のホモロジーは 52%、SREB2 と SREB3 のホモロジーは 63% と既存の G 蛋白質共役型レセプターとのホモロジーに比べ有意に高い (図 1) 。このことは本発明の G 蛋白質共役型レセプター SREB1、SREB2、SREB3 が既存の G 蛋白質共役型レセプターとは独立した新規な G 蛋

白質共役型レセプターファミリーを形成していることを示している。

【0037】

(実施例2) 組織におけるヒト新規G蛋白質共役型レセプターファミリー遺伝子の発現分布

Northern blot hybridization法により本発明のG蛋白質共役型レセプター遺伝子の発現分布を解析した。ヒトSREB1のprobeにはcDNA断片(配列番号: 1の第722番目から第1054番目)を用いた。ヒトの各臓器由来のpoly A⁺ RNA (2 μ g) をプロットしたメンブレン (Clontech社) とprobeのhybridizationは50%

formamide、5x SSPE、10 x Denhardt's溶液、2% SDS、100 μ g/ml変性サケ精子DNAを含む溶液中で、42℃ (18時間) で行った。メンブレンは、最終的に0.2 x SSC、0.1% SDSを含む溶液で2回 (65℃、30分) 洗浄した。ヒトの各臓器 (心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巢、卵巣、小腸、大腸、末梢血白血球) についてNorthern解析を行ったところ、図2に示すように3

kbのmRNAが脳、卵巣、精巢、心臓、前立腺で、3 kbと2.3 kbのmRNAが末梢血白血球で検出された。また、脾臓でも3kbのシグナルが若干検出された。さらに、ヒト脳の各領域 (扁桃核、尾状核、脳梁、海馬、黒質、視床下核、視床、小脳、大脳皮質、延髄、脊髄、大脳皮質後頭葉、大脳皮質前頭葉、大脳皮質側頭葉、被殻) についてもNorthern解析を行った。本発明のG蛋白質共役型レセプターヒトSREB1遺伝子の3

kbのmRNAは調べた全てのヒト脳領域で検出され、ヒト脳内で広範に発現していることがわかった (図3)。

【0038】

ヒトSREB2のprobeにはcDNA断片(配列番号: 3の第558番目から第888番目)を用いた。上記同条件でNorthern解析を行ったところ、図4に示すように3.2 kbのmRNAが脳で、2.4 kb、3.5 kb、6.3 kbのmRNAが精巢で検出された。また、3.5

kbのシグナルが胎盤、脾臓で、3.2 kbのシグナルが小腸で若干検出された。本発

明の G 蛋白質共役型レセプターヒト SREB2 遺伝子の 3.2

kb の mRNA は脳の中でも扁桃体、尾状核、海馬、黒質、視床下核、視床、小脳、大脳皮質群、被殻で多く検出され、脳梁、延髄、脊髄ではあまり検出されなかった。また、脳各領域で 7.8

kb のシグナルが若干検出された。

ヒト SREB3 の probe には cDNA 断片（配列番号：5 の第 1 番目から第 652 番目）を用いた。上記同条件で Northern 解析を行ったところ、4

kb、5.1 kb の mRNA が脳で、4 kb、5.1 kb、9.7 kb の mRNA が卵巣で検出された。本発明の G 蛋白質共役型レセプターヒト SREB3 遺伝子の mRNA は脳の各領域で 4

kb をメインに 5.1 kb、若干 9.7 kb のシグナルとして検出され、4 kb の mRNA は扁桃体、海馬、視床下核、小脳、大脳皮質で、5.1

kb の mRNA は黒質、視床下核、脊髄で比較的多く検出された。

以上の結果より、本発明の G 蛋白質共役型レセプターファミリー遺伝子 SREB1、SREB2、SREB3 は中枢神経系、泌尿器生殖器系を中心に発現していることが示された。

【0039】

（実施例 3）ヒト新規 G 蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質の発現の確認
ヒト SREB1、SREB2、SREB3 を発現させるための発現ベクターとして pCEP4（Invitrogen 社）を用いた。そのとき、ヒト SREB1、SREB2、SREB3 の N 末端にマーカー配列として FLAG

epitope を融合するために、SREB1、SREB2、SREB3 の蛋白質コーディング配列の 5' 末端に ATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGGGATCCTG（配列番号：13）を挿入した。このように構築したプラスミドはそれぞれ、pCEP4-FL-SREB1、pCEP4-FL-SREB2、pCEP4-FL-SREB3 とした。これらのプラスミドを用いることで、ヒト SREB1、SREB2、SREB3 のポリペプチドの N 末端に Met

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ile Leu（配列番号 14）が融合したポリペプチドが発現する。

10cm シャーレに 293-EBNA（Invitrogen 社）を 1×10^6 細胞で播種して 1 日培養後、8 μ g の pCEP4-FL-SREB1、pCEP4-FL-SREB2、pCEP4-FL-SREB3 および pCEP4-FL（ベク

ターのみ) をFuGENE6 (Boeringer Mannheim社) を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入後、一日培養した細胞を回収、洗浄後、20 mM Tris.HCl(pH7.4)/150 mM NaCl/コンプリートTM (Boeringer Mannheim社) に懸濁してポリトロンにてホモジェナイズした。ホモジェネートに最終濃度0.2%、0.1%、0.2%になるようにTriton X-100、Digitonin、sodium cholateを加え、4℃で2時間インキュベーションし、可溶化した。可溶化サンプルからM2-agarose (Sigma社) を用いてFLAG epitope融合蛋白を免疫沈降した。免疫沈降物を200 μ M FLAG peptide/20 mM Tris.HCl(pH7.4)/150 mM NaClで溶出した。溶出サンプルは濃縮後、SDS/10%~20% アクリルアミドゲル (第一化学薬品社) を用いて電気泳動後、ブロッティング装置を用いてPVDF膜に転写した。転写後のPVDF膜に、ブロッキング後、マウス抗FLAGモノクローナル抗体 (M2; Sigma社)、西洋わさびパーオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgGポリクローナル抗体 (Zymed社) を順次反応させた。反応後、ECL ウェスタンブロッティング検出システムを用いてSREB1、SREB2、SREB3蛋白質の発現を確認した (図5)。

抗FLAG抗体と反応する蛋白質はpCEP4-FLを導入した細胞には存在しないが、pCEP4-FL-SREB1、pCEP4-FL-SREB2、pCEP4-FL-SREB3を導入した細胞では、35-45 kDaのバンドとして検出された。ヒトSREB1、ヒトSREB2、またはヒトSREB3の推定分子量はそれぞれ、39.8 kDa、42.0 kDa、41.5 kDaであり、ほぼ予測される分子量にバンドが存在した。また、ヒトSREB1では二量体と考えられる65-75 kDaのバンドも検出された。

【0040】

(実施例4) ラットSREB1(rSREB1)、ラットSREB2(rSREB2)、またはラットSREB3(rSREB3)蛋白質をコードする遺伝子の単離

rSREB1、rSREB2、又はrSREB3をコードする全長cDNAは、ラット脳由来のpoly A⁺ RNA (Clontech社) をtemplateとしてRT-PCRにより取得した。

rSREB1の増幅にはforward primerとして5'-AAAATCTAGA CGGCGATGGCGAACGCTAGTGA-3' (配列番号: 15)、reverse primerとして5'-AAAATCTAGA CACTTTGAGAGTCTTGTGAAGGC-3' (配列番号: 16) を用いた (それぞれの5'末端にはXbaI siteが付加してある)。cDNAの増幅、クローニング、塩基配列決定は実施例1と同様の方法で行った。明らかになった配列を配列表 配列番号: 21に示す。

同配列は1131 baseのopen reading frame (配列番号: 21の第1番目から第1131番目) を持っている。open reading frameから予測されるアミノ酸配列 (377アミノ酸) を配列表 配列番号: 22に示す。予想アミノ酸配列はヒトSREB1と97%一致していることから、本遺伝子がrSREB1をコードすることが解った。

rSREB2の増幅にはforward primerとして5'-AAAATCTAGA TCTATGGCGAACTATAGCCA TGC-3' (配列番号: 17)、reverse primerとして5'-AAAATCTAGA AAGGCTAAAGATTTACAGATGCTCC-3' (配列番号: 18) を用いた (それぞれの5'末端にはXbaI siteが付加してある)。cDNAの増幅、クローニング、塩基配列決定は実施例1と同様の方法で行った。明らかになった配列を配列表 配列番号: 23に示す。

同配列は1110 baseのopen reading frame (配列番号: 23の第1番目から第1110番目) を持っている。open reading frameから予測されるアミノ酸配列 (370アミノ酸) を配列表 配列番号: 24に示す。予想アミノ酸配列はヒトSREB2と100%一致していることから、本遺伝子がrSREB2をコードすることが解った。

rSREB3の増幅にはforward primerとして5'-AAAATCTAGA CAAATACTGAACTGGCCGATCCCC-3' (配列番号: 19)、reverse primerとして5'-AAAATCTAGA TGTTGGCCCCAGTATGGTGATCAT-3' (配列番号: 20) を用いた (それぞれの5'末端にはXbaI siteが付加してある)。cDNAの増幅、クローニング、塩基配列決定は実施例1と同様の方法で行った。明らかになった配列を配列表 配列番号: 25に示す。

同配列は1119 baseのopen reading frame (配列番号: 25の第1番目から第1119番目) を持っている。

9番目)を持っている。open

reading frameから予測されるアミノ酸配列(373アミノ酸)を配列表 配列番号 : 26に示す。予想アミノ酸配列はヒトSREB3と99%一致していることから、本遺伝子がrSREB3をコードすることが解った。

【0041】

【発明の効果】

本発明により、中枢神経系に発現している新規なG蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質SREB1、SREB2、またはSREB3、該蛋白質をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法が提供された。

また、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質と被験薬を接触させることにより、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を修飾する化合物およびペプチドをスクリーニングし、新たな医薬、特に、新たな中枢性疾患治療剤をスクリーニングすることを可能にした。

【0042】

本発明の中枢神経系に発現しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性を特異的に修飾する化合物およびペプチドを有効成分とする医薬は、中枢神経系の機能性/器質性疾患の治療薬剤等としての有用性が期待できる。また、本発明のG蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質は中枢神経系のみならず、泌尿器生殖器系で発現していることから、その活性を特異的に修飾する化合物およびペプチドを有効成分とする医薬は泌尿器生殖器系に関わる疾患の治療薬剤等としての有用性が期待できる。また、本発明のG蛋白質共役型レセプターの内例えばSREB1蛋白質は中枢神経系、泌尿器生殖器系に加え、心臓、末梢白血球で発現していることからSREB1蛋白質の活性を特異的に修飾する化合物およびペプチドを有効成分とする医薬は中枢性疾患、泌尿器生殖器系に関わる疾患に加え循環器系疾患、免疫炎症系疾患の治療薬剤等としての有用性が期待できる。

【0043】

本発明新規G蛋白質共役型レセプターファミリーSREB1、SREB2、またはSREB3はヒトとラットでアミノ酸の保存率が極めて高い。この保存率は既存のG蛋白質

共役型レセプターファミリーの中で最も高く、このことは新規G蛋白質共役型レセプターファミリー-SREB1、SREB2、及びSREB3の生体内での役割、特に中枢神経系での生理的役割の重要性を示していると考えられる。また、ヒトとラットでアミノ酸配列が97%以上の保存率を示していることから、本新規G蛋白質共役型レセプターファミリー-SREB1、SREB2、SREB3に作用する薬物の活性には種差が殆ど無いと考えられる。従って、本発明のG蛋白質共役型レセプターは、それ自体又は当該レセプターを用いたスクリーニングから得られた化合物又は蛋白質を医薬として開発する際、ヒトに対する薬理効果を試験するに先立って、予め、例えばラット等の動物実験を行うことができるという利点があり、動物実験データからデータからヒトの臨床データを予測することが容易である点で有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、SREB1、SREB2、SREB3のアミノ酸配列のアラインメントを示す。

【図2】 図2は、SREB1のヒト臓器の各領域についてのノーザン解析の結果を示す。

【図3】 図3は、SREB1のヒト脳各領域についてのノーザン解析の結果を示す。

【図4】 図4は、SREB2のヒト臓器の各領域についてのノーザン解析の結果を示す。

【図5】 図5は、SREB1、SREB2、SREB3蛋白質の発現を確認した結果を示す。

【0044】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> A novel G protein coupled receptor protein

~~<130> 2858~~

<140>

<141>

<160> 26

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1128

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1125)

<223> SREB1

<400> 1

atg gcg aac gcg agc gag ccg ggt ggc agc ggc ggc ggc gag gcg gcc

48

Met Ala Asn Ala Ser Glu Pro Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ala Ala

1

5

10

15

gcc ctg ggc ctc aag ctg gcc acg ctc agc ctg ctg ctg tgc gtg agc

96

Ala Leu Gly Leu Lys Leu Ala Thr Leu Ser Leu Leu Leu Cys Val Ser

20

25

30

cta gcg ggc aac gtg ctg ttc gcg ctg ctg atc gtg cgg gag cgc agc

144

Leu Ala Gly Asn Val Leu Phe Ala Leu Leu Ile Val Arg Glu Arg Ser

35

40

45

ctg cac cgc gcc ccg tac tac ctg ctg ctc gac ctg tgc ctg gcc gac

192

Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Leu Leu Leu Asp Leu Cys Leu Ala Asp

50

55

60

ggg ctg cgc gcg ctc gcc tgc ctc ccg gcc gtc atg ctg gcg gcg cgg

240

Gly Leu Arg Ala Leu Ala Cys Leu Pro Ala Val Met Leu Ala Ala Arg

65

70

75

80

cg t gcg gcg gcc gcg gcg ggg gcg ccg ccg ggc gcg ctg ggc tgc aag

288

Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Pro Pro Gly Ala Leu Gly Cys Lys

85

90

95

ctg ctc gcc ttc ctg gcc gcg ctc ttc tgc ttc cac gcc gcc ttc ctg

336

Leu Leu Ala Phe Leu Ala Ala Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe Leu

100

105

110

ctg ctg ggc gtg ggc gtc acc cgc tac ctg gcc atc gcg cac cac cgc

384

Leu Leu Gly Val Gly Val Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His Arg

115

120

125

ttc tat gca gag cgc ctg gcc ggc tgg ccg tgc gcc gcc atg ctg gtg

432

Phe Tyr Ala Glu Arg Leu Ala Gly Trp Pro Cys Ala Ala Met Leu Val

130

135

140

tgc gcc gcc tgg gcg ctg gcg ctg gcc gcg gcc ttc ccg cca gtg ctg

480

Cys Ala Ala Trp Ala Leu Ala Leu Ala Ala Ala Phe Pro Pro Val Leu

145

150

155

160

gac ggc ggt ggc gac gac gag gac gcg ccg tgc gcc ctg gag cag cgg

528

Asp Gly Gly Gly Asp Asp Glu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Glu Gln Arg

165

170

175

ccc gac ggc gcc ccc ggc gcg ctg ggc ttc ctg ctg ctg gcc gtg

576

Pro Asp Gly Ala Pro Gly Ala Leu Gly Phe Leu Leu Leu Ala Val

180

185

190

gtg gtg ggc gcc acg cac ctc gtc tac ctc cgc ctg ctc ttc ttc atc

624

Val Val Gly Ala Thr His Leu Val Tyr Leu Arg Leu Leu Phe Phe Ile

195

200

205

cac gac cgc cgc aag atg cgg ccc gcg cgc ctg gtg ccc gcc gtc agc

672

His Asp Arg Arg Lys Met Arg Pro Ala Arg Leu Val Pro Ala Val Ser

210

215

220

cac gac tgg acc ttc cac ggc ccg ggc gcc acc ggc cag gcg gcc gcc

720

His Asp Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln Ala Ala Ala

225 230 235 240

aac tgg acg gcg ggc ttc ggc cgc ggg ccc acg ccg ccc gcg ctt gtg
768

Asn Trp Thr Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Ala Leu Val

245 250 255

ggc atc cgg ccc gca ggg ccg ggc cgc ggc gcg cgc cgc ctc ctc gtg
816

Gly Ile Arg Pro Ala Gly Pro Gly Arg Gly Ala Arg Arg Leu Leu Val

260 265 270

ctg gaa gaa ttc aag acg gag aag agg ctg tgc aag atg ttc tac gcc
864

Leu Glu Glu Phe Lys Thr Glu Lys Arg Leu Cys Lys Met Phe Tyr Ala

275 280 285

gtc acg ctg ctc ttc ctg ctc ctc tgg ggg ccc tac gtc gtg gcc agc
912

Val Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Gly Pro Tyr Val Val Ala Ser

290 295 300

tac ctg cgg gtc ctg gtg cgg ccc ggc gcc gtc ccc cag gcc tac ctg
960

Tyr Leu Arg Val Leu Val Arg Pro Gly Ala Val Pro Gln Ala Tyr Leu

305

310

315

320

acg gcc tcc gtg tgg ctg acc ttc gcg cag gcc ggc atc aac ccc gtc

1008

Thr Ala Ser Val Trp Leu Thr Phe Ala Gln Ala Gly Ile Asn Pro Val

325

330

335

gtg tgc ttc ctc ttc aac agg gag ctg agg gac tgc ttc agg gcc cag

1056

Val Cys Phe Leu Phe Asn Arg Glu Leu Arg Asp Cys Phe Arg Ala Gln

340

345

350

ttc ccc tgc tgc cag agc ccc cgg acc acc cag gcg acc cat ccc tgc

1104

Phe Pro Cys Cys Gln Ser Pro Arg Thr Thr Gln Ala Thr His Pro Cys

355

360

365

gac ctg aaa ggc att ggt tta tga

1128

Asp Leu Lys Gly Ile Gly Leu

370

375

<210> 2

<211> 375

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Asn Ala Ser Glu Pro Gly Gly Ser Gly Gly Gly Glu Ala Ala

1 5 10 15

Ala Leu Gly Leu Lys Leu Ala Thr Leu Ser Leu Leu Leu Cys Val Ser

20 25 30

Leu Ala Gly Asn Val Leu Phe Ala Leu Leu Ile Val Arg Glu Arg Ser

35 40 45

Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Leu Leu Leu Asp Leu Cys Leu Ala Asp

50 55 60

Gly Leu Arg Ala Leu Ala Cys Leu Pro Ala Val Met Leu Ala Ala Arg

65 70 75 80

Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Pro Pro Gly Ala Leu Gly Cys Lys

85

90

95

Leu Leu Ala Phe Leu Ala Ala Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe Leu

100

105

110

Leu Leu Gly Val Gly Val Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His Arg

115

120

125

Phe Tyr Ala Glu Arg Leu Ala Gly Trp Pro Cys Ala Ala Met Leu Val

130

135

140

Cys Ala Ala Trp Ala Leu Ala Leu Ala Ala Ala Phe Pro Pro Val Leu

145

150

155

160

Asp Gly Gly Gly Asp Asp Glu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Glu Gln Arg

165

170

175

Pro Asp Gly Ala Pro Gly Ala Leu Gly Phe Leu Leu Leu Ala Val

180

185

190

Val Val Gly Ala Thr His Leu Val Tyr Leu Arg Leu Leu Phe Phe Ile

195

200

205

His Asp Arg Arg Lys Met Arg Pro Ala Arg Leu Val Pro Ala Val Ser

210

215

220

His Asp Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln Ala Ala Ala

225

230

235

240

Asn Trp Thr Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Ala Leu Val

245

250

255

Gly Ile Arg Pro Ala Gly Pro Gly Arg Gly Ala Arg Arg Leu Leu Val

260

265

270

Leu Glu Glu Phe Lys Thr Glu Lys Arg Leu Cys Lys Met Phe Tyr Ala

275

280

285

Val Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Gly Pro Tyr Val Val Ala Ser

290

295

300

Tyr Leu Arg Val Leu Val Arg Pro Gly Ala Val Pro Gln Ala Tyr Leu

305

310

315

320

Thr Ala Ser Val Trp Leu Thr Phe Ala Gln Ala Gly Ile Asn Pro Val

325

330

335

Val Cys Phe Leu Phe Asn Arg Glu Leu Arg Asp Cys Phe Arg Ala Gln

340

345

350

Phe Pro Cys Cys Gln Ser Pro Arg Thr Thr Gln Ala Thr His Pro Cys

355

360

365

Asp Leu Lys Gly Ile Gly Leu

370

375

<210> 3

<211> 1113

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1110)

<223> SREB2

<400> 3

atg gcg aac tat agc cat gca gct gac aac att ttg caa aat ctc tcg

48

Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn Ile Leu Gln Asn Leu Ser

1

5

10

15

cct cta aca gcc ttt ctg aaa ctg act tcc ttg ggt ttc ata ata gga

96

Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe Ile Ile Gly

20

25

30

gtc agc gtg gtg ggc aac ctc ctg atc tcc att ttg cta gtg aaa gat

144

Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu Ile Ser Ile Leu Leu Val Lys Asp

35

40

45

aag acc ttg cat aga gca cct tac tac ttc ctg ttg gat ctt tgc tgt

192

Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys

50

55

60

tca gat atc ctc aga tct gca att tgt ttc cca ttt gtg ttc aac tct

240

Ser Asp Ile Leu Arg Ser Ala Ile Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser

65

70

75

80

gtc aaa aat ggc tct acc tgg act tat ggg act ctg act tgc aaa gtg

288

Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val

85

90

95

att gcc ttt ctg ggg gtt ttg tcc tgt ttc cac act gct ttc atg ctc

336

Ile Ala Phe Leu Gly Val Leu Ser Cys Phe His Thr Ala Phe Met Leu

100

105

110

ttc tgc atc agt gtc acc aga tac tta gct atc gcc cat cac cgc ttc

384

Phe Cys Ile Ser Val Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His Arg Phe

115

120

125

tat aca aag agg ctg acc ttt tgg acg tgt ctg gct gtg atc tgt atg

432

Tyr Thr Lys Arg Leu Thr Phe Trp Thr Cys Leu Ala Val Ile Cys Met

130

135

140

gtg tgg act ctg tct gtg gcc atg gca ttt ccc ccg gtt tta gac gtg

480

Val Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Leu Asp Val

145

150

155

160

ggc act tac tca ttc att agg gag gaa gat caa tgc acc ttc caa cac

528

Gly Thr Tyr Ser Phe Ile Arg Glu Glu Asp Gln Cys Thr Phe Gln His

165

170

175

cgc tcc ttc agg gct aat gat tcc tta gga ttt atg ctg ctt ctt gct

576

Arg Ser Phe Arg Ala Asn Asp Ser Leu Gly Phe Met Leu Leu Leu Ala

180

185

190

ctc atc ctc cta gcc aca cag ctt gtc tac ctc aag ctg ata ttt ttc

624

Leu Ile Leu Leu Ala Thr Gln Leu Val Tyr Leu Lys Leu Ile Phe Phe

195

200

205

gtc cac gat cga aga aaa atg aag cca gtc cag ttt gta gca gca gtc

672

Val His Asp Arg Arg Lys Met Lys Pro Val Gln Phe Val Ala Ala Val

210

215

220

agc cag aac tgg act ttt cat ggt cct gga gcc agt ggc cag gca gct

720

Ser Gln Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Ala Ala

225

230

235

240

gcc aat tgg cta gca gga ttt gga agg ggt ccc aca cca ccc acc ttg

768

Ala Asn Trp Leu Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Thr Leu

245

250

255

ctg ggc atc agg caa aat gca aac acc aca ggc aga aga agg cta ttg

816

Leu Gly Ile Arg Gln Asn Ala Asn Thr Thr Gly Arg Arg Arg Leu Leu

260

265

270

gtc tta gac gag ttc aaa atg gag aaa aga atc agc aga atg ttc tat

864

Val Leu Asp Glu Phe Lys Met Glu Lys Arg Ile Ser Arg Met Phe Tyr

275

280

285

ata atg act ttt ctg ttt cta acc ttg tgg ggc ccc tac ctg gtg gcc

912

Ile Met Thr Phe Leu Phe Leu Thr Leu Trp Gly Pro Tyr Leu Val Ala

290

295

300

tgt tat tgg aga gtt ttt gca aga ggg cct gta gta cca ggg gga ttt

960

Cys Tyr Trp Arg Val Phe Ala Arg Gly Pro Val Val Pro Gly Gly Phe

305

310

315

320

cta aca gct gct gtc tgg atg agt ttt gcc caa gca gga atc aat cct

1008

Leu Thr Ala Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Gly Ile Asn Pro

325

330

335

ttt gtc tgc att ttc tca aac agg gag ctg agg cgc tgt ttc agc aca

1056

Phe Val Cys Ile Phe Ser Asn Arg Glu Leu Arg Arg Cys Phe Ser Thr

340

345

350

acc ctt ctt tac tgc aga aaa tcc agg tta cca agg gaa cct tac tgt

1104

Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Glu Pro Tyr Cys

355

360

365

gtt ata tga

1113

Val Ile

370

<210> 4

<211> 370

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn Ile Leu Gln Asn Leu Ser

1 5 10 15

Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe Ile Ile Gly

20 25 30

Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu Ile Ser Ile Leu Leu Val Lys Asp

35 40 45

Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys

50

55

60

Ser Asp Ile Leu Arg Ser Ala Ile Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser

65

70

75

80

Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val

85

90

95

Ile Ala Phe Leu Gly Val Leu Ser Cys Phe His Thr Ala Phe Met Leu

100

105

110

Phe Cys Ile Ser Val Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His Arg Phe

115

120

125

Tyr Thr Lys Arg Leu Thr Phe Trp Thr Cys Leu Ala Val Ile Cys Met

130

135

140

Val Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Leu Asp Val

145

150

155

160

Gly Thr Tyr Ser Phe Ile Arg Glu Glu Asp Gln Cys Thr Phe Gln His

165

170

175

Arg Ser Phe Arg Ala Asn Asp Ser Leu Gly Phe Met Leu Leu Leu Ala

180

185

190

Leu Ile Leu Leu Ala Thr Gln Leu Val Tyr Leu Lys Leu Ile Phe Phe

195

200

205

Val His Asp Arg Arg Lys Met Lys Pro Val Gln Phe Val Ala Ala Val

210

215

220

Ser Gln Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Ala Ala

225

230

235

240

Ala Asn Trp Leu Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Thr Leu

245

250

255

Leu Gly Ile Arg Gln Asn Ala Asn Thr Thr Gly Arg Arg Arg Leu Leu

260

265

270

Val Leu Asp Glu Phe Lys Met Glu Lys Arg Ile Ser Arg Met Phe Tyr

275

280

285

Ile Met Thr Phe Leu Phe Leu Thr Leu Trp Gly Pro Tyr Leu Val Ala

290

295

300

Cys Tyr Trp Arg Val Phe Ala Arg Gly Pro Val Val Pro Gly Gly Phe

305

310

315

320

Leu Thr Ala Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Gly Ile Asn Pro

325

330

335

Phe Val Cys Ile Phe Ser Asn Arg Glu Leu Arg Arg Cys Phe Ser Thr

340

345

350

Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Glu Pro Tyr Cys

355

360

365

Val Ile

370

<210> 5

<211> 1122

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1119)

<223> SREB3

<400> 5

atg gcc aac act acc gga gag cct gag gag gtg agc ggc gct ctg tcc

48

Met Ala Asn Thr Thr Gly Glu Pro Glu Glu Val Ser Gly Ala Leu Ser

1

5

10

15

cca ccg tcc gca tca gct tat gtg aag ctg gta ctg ctg gga ctg att

96

Pro Pro Ser Ala Ser Ala Tyr Val Lys Leu Val Leu Leu Gly Leu Ile

20

25

30

atg tgc gtg agc ctg gcg ggt aac gcc atc ttg tcc ctg ctg gtg ctc

144

Met Cys Val Ser Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Ser Leu Leu Val Leu

35

40

45

aag gag cgt gcc ctg cac aag gct cct tac tac ttc ctg ctg gac ctg

192

Lys Glu Arg Ala Leu His Lys Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu

50

55

60

tgc ctg gcc gat ggc ata cgc tct gcc gtc tgc ttc ccc ttt gtg ctg

240

Cys Leu Ala Asp Gly Ile Arg Ser Ala Val Cys Phe Pro Phe Val Leu

65

70

75

80

gct tct gtg cgc cac ggc tct tca tgg acc ttc agt gca ctc agc tgc

288

Ala Ser Val Arg His Gly Ser Ser Trp Thr Phe Ser Ala Leu Ser Cys

85

90

95

aag att gtg gcc ttt atg gcc gtg ctc ttt tgc ttc cat gcg gcc ttc

336

Lys Ile Val Ala Phe Met Ala Val Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe

100

105

110

atg ctg ttc tgc atc agc gtc acc cgc tac atg gcc atc gcc cac cac

384

Met Leu Phe Cys Ile Ser Val Thr Arg Tyr Met Ala Ile Ala His His

115

120

125

cgc ttc tac gcc aag cgc atg aca ctc tgg aca tgc gcg gct gtc atc

432

Arg Phe Tyr Ala Lys Arg Met Thr Leu Trp Thr Cys Ala Ala Val Ile

130

135

140

tgc atg gcc tgg acc ctg tct gtg gcc atg gcc ttc cca cct gtc ttt

480

Cys Met Ala Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Phe

145

150

155

160

gac gtg ggc acc tac aag ttt att cgg gag gag gac cag tgc atc ttt

528

Asp Val Gly Thr Tyr Lys Phe Ile Arg Glu Glu Asp Gln Cys Ile Phe

165

170

175

gag cat cgc tac ttc aag gcc aat gac acg ctg ggc ttc atg ctt atg

576

Glu His Arg Tyr Phe Lys Ala Asn Asp Thr Leu Gly Phe Met Leu Met

180

185

190

ttg gct gtg ctc atg gca gct acc cat gct gtc tac ggc aag ctg ctc

624

Leu Ala Val Leu Met Ala Ala Thr His Ala Val Tyr Gly Lys Leu Leu

195

200

205

ctc ttc gag tat cgt cac cgc aag atg aag cca gtg cag atg gtg cca

672

Leu Phe Glu Tyr Arg His Arg Lys Met Lys Pro Val Gln Met Val Pro

210

215

220

gcc atc agc cag aac tgg aca ttc cat ggt ccc ggg gcc acc ggc cag

720

Ala Ile Ser Gln Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln

225

230

235

240

gct gct gcc aac tgg atc gcc ggc ttt ggc cgt ggg ccc atg cca cca

768

Ala Ala Ala Asn Trp Ile Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Met Pro Pro

245

250

255

acc ctg ctg ggt atc cgg cag aat ggg cat gca gcc agc cgg cgg cta

816

Thr Leu Leu Gly Ile Arg Gln Asn Gly His Ala Ala Ser Arg Arg Leu

260

265

270

ctg ggc atg gac gag gtc aag ggt gaa aag cag ctg ggc cgc atg ttc

864

Leu Gly Met Asp Glu Val Lys Gly Glu Lys Gln Leu Gly Arg Met Phe

275

280

285

tac gcg atc aca ctg ctc ttt ctg ctc ctc tgg tca ccc tac atc gtg

912

Tyr Ala Ile Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Ser Pro Tyr Ile Val

290

295

300

gcc tgc tac tgg cga gtg ttt gtg aaa gcc tgt gct gtg ccc cac cgc

960

Ala Cys Tyr Trp Arg Val Phe Val Lys Ala Cys Ala Val Pro His Arg

305

310

315

320

tac ctg gcc act gct gtt tgg atg agc ttc gcc cag gct gcc gtc aac

1008

Tyr Leu Ala Thr Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Ala Val Asn

325

330

335

cca att gtc tgc ttc ctg ctc aac aag gac ctc aag aag tgc ctg agg

1056

Pro Ile Val Cys Phe Leu Leu Asn Lys Asp Leu Lys Lys Cys Leu Arg

340

345

350

act cac gcc ccc tgc tgg ggc aca gga ggt gcc ccg gct ccc aga gaa

1104

Thr His Ala Pro Cys Trp Gly Thr Gly Gly Ala Pro Ala Pro Arg Glu

355

360

365

ccc tac tgt gtc atg tga

1122

Pro Tyr Cys Val Met

370

<210> 6

<211> 373

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ala Asn Thr Thr Gly Glu Pro Glu Glu Val Ser Gly Ala Leu Ser

1

5

10

15

Pro Pro Ser Ala Ser Ala Tyr Val Lys Leu Val Leu Leu Gly Leu Ile

20

25

30

Met Cys Val Ser Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Ser Leu Leu Val Leu

35

40

45

Lys Glu Arg Ala Leu His Lys Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu

50

55

60

Cys Leu Ala Asp Gly Ile Arg Ser Ala Val Cys Phe Pro Phe Val Leu

65

70

75

80

Ala Ser Val Arg His Gly Ser Ser Trp Thr Phe Ser Ala Leu Ser Cys

85

90

95

Lys Ile Val Ala Phe Met Ala Val Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe

100

105

110

Met Leu Phe Cys Ile Ser Val Thr Arg Tyr Met Ala Ile Ala His His

115

120

125

Arg Phe Tyr Ala Lys Arg Met Thr Leu Trp Thr Cys Ala Ala Val Ile

130

135

140

Cys Met Ala Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Phe

145 150 155 160

Asp Val Gly Thr Tyr Lys Phe Ile Arg Glu Glu Asp Gln Cys Ile Phe

165 170 175

Glu His Arg Tyr Phe Lys Ala Asn Asp Thr Leu Gly Phe Met Leu Met

180 185 190

Leu Ala Val Leu Met Ala Ala Thr His Ala Val Tyr Gly Lys Leu Leu

195 200 205

Leu Phe Glu Tyr Arg His Arg Lys Met Lys Pro Val Gln Met Val Pro

210 215 220

Ala Ile Ser Gln Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln

225 230 235 240

Ala Ala Ala Asn Trp Ile Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Met Pro Pro

245 250 255

Thr Leu Leu Gly Ile Arg Gln Asn Gly His Ala Ala Ser Arg Arg Leu

260

265

270

Leu Gly Met Asp Glu Val Lys Gly Glu Lys Gln Leu Gly Arg Met Phe

275

280

285

Tyr Ala Ile Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Ser Pro Tyr Ile Val

290

295

300

Ala Cys Tyr Trp Arg Val Phe Val Lys Ala Cys Ala Val Pro His Arg

305

310

315

320

Tyr Leu Ala Thr Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Ala Val Asn

325

330

335

Pro Ile Val Cys Phe Leu Leu Asn Lys Asp Leu Lys Lys Cys Leu Arg

340

345

350

Thr His Ala Pro Cys Trp Gly Thr Gly Gly Ala Pro Ala Pro Arg Glu

355

360

365

Pro Tyr Cys Val Met

370

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Forward primer

<400> 7

aaaatctaga cgcgatggcg aacgcgagcg a

31

<210> 8

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:reverse primer

<400> 8

aaaatctaga gtctatgtgg cggggcctcc c

31

<210> 9

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Forward primer

<400> 9

aaaatctaga tctatggcga actatagcca tgca

34

<210> 10

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:reverse primer

<400> 10

aaaatctaga aaggctaaag attacagat gctcc

35

<210> 11

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Forward primer

<400> 11

aaaatctaga gtatggccaa cactaccgga gag

33

<210> 12

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:reverse primer

<400> 12

aaaatctaga cctgtctgcc taccagcctg c

31

<210> 13

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:FLAG epitope

<400> 13

atggactaca aggacgacga tgacaagggg atcctg

36

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:FLAG epitope

<400> 14

Met Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Ile Leu

1

5

10

<210> 15

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Forward primer

<400> 15

aaaatctaga cggcgatggc gaacgctagt ga

32

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:reverse primer

<400> 16

aaaatctaga cactttgaga gtcttgtgaa ggc

33

<210> 17

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Forward primer

<400> 17

aaaatctaga tctatggcga actatagcca tgc

33

<210> 18

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Forward primer

<400> 18

aaaatctaga aaggctaaag atttacagat gctcc

35

<210> 19

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:reverse primer

<400> 19

aaaatctaga caaatactga actggccgat cccc

34

<210> 20

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:reverse primer

<400> 20

aaaatctaga tgttgccccc agtatggtga tcat

34

<210> 21

<211> 1134

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1131)

<223> Rat SREB1

<400> 21

atg gcg aac gct agt gag ccg ggc ggc ggc ggc ggc ggc gcc gag gct

48

Met Ala Asn Ala Ser Glu Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Ala

1

5

10

15

gcc gcg ctg ggc ctc agg ctg gcc aca ctc agc ctg ctg ctg tgc gtg

96

Ala Ala Leu Gly Leu Arg Leu Ala Thr Leu Ser Leu Leu Leu Cys Val

20

25

30

agc ctg gcg ggc aac gtg ctg ttc gct ctg ctc atc gtg agg gag cgc

144

Ser Leu Ala Gly Asn Val Leu Phe Ala Leu Leu Ile Val Arg Glu Arg

35

40

45

agc ctg cac cgc gcg cct tac tac ctg ctg ctc gac ctg tgc ctg gcc

192

Ser Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Leu Leu Leu Asp Leu Cys Leu Ala

50

55

60

gac ggg ctg cgc gcg ctc gcc tgt ctc ccg gcc gtc atg ctg gct gcg

240

Asp Gly Leu Arg Ala Leu Ala Cys Leu Pro Ala Val Met Leu Ala Ala

65

70

75

80

cgg cgc gcg gca gcc gcg gcg ggg acg cct ccg ggt gcg ctg ggc tgc

288

Arg Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Thr Pro Pro Gly Ala Leu Gly Cys

85

90

95

aag ctg ctg gcc ttc ctg gcc gcg ctc ttc tgc ttc cac gcg gcc ttc

336

Lys Leu Leu Ala Phe Leu Ala Ala Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe

100

105

110

ctg ctg ctg ggc gtg ggc gtc acc cgc tac ctg gcc atc gct cac cac

384

Leu Leu Leu Gly Val Gly Val Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His

115

120

125

cgc ttc tat gcc gag cgc ctg gcc ggc tgg ccg tgc gcc gcg atg ctg

432

Arg Phe Tyr Ala Glu Arg Leu Ala Gly Trp Pro Cys Ala Ala Met Leu

130

135

140

gtg tgc gcc gcc tgg gcg ctg gct ttg gcc gcg gcc ttc ccg ccg gtg

480

Val Cys Ala Ala Trp Ala Leu Ala Leu Ala Ala Ala Phe Pro Pro Val

145

150

155

160

ctg gac ggc ggt ggc gcg gac gac gag gat gcg ccg tgc gcc ctg gag

528

Leu Asp Gly Gly Gly Ala Asp Asp Glu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Glu

165

170

175

cag cgg ccc gac ggc gcc ccg ggt gcg cta ggc ttc ctg ctg ctc ctg

576

Gln Arg Pro Asp Gly Ala Pro Gly Ala Leu Gly Phe Leu Leu Leu Leu

180

185

190

gcc gcg gtg gtg ggc gcc acg cac ctc gtc tac ctt cgc ctg ctc ttc

624

Ala Ala Val Val Gly Ala Thr His Leu Val Tyr Leu Arg Leu Leu Phe

195

200

205

ttc atc cac gac cgc cgc aag atg cgg ccc gca cgc ctg gtg ccc gcc

672

Phe Ile His Asp Arg Arg Lys Met Arg Pro Ala Arg Leu Val Pro Ala

210

215

220

gtc agc cac gac tgg acc ttc cac ggc ccg ggc gcc acc ggt caa gcg

720

Val Ser His Asp Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln Ala

225

230

235

240

gcc gcc aac tgg acg gcg ggc ttc ggc cgc ggg ccc acg cca cct gcg

768

Ala Ala Asn Trp Thr Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Ala

245

250

255

ctc gtg ggc atc agg cct gca ggc ccg ggc cgc gga gcc cgg cgc ctc

816

Leu Val Gly Ile Arg Pro Ala Gly Pro Gly Arg Gly Ala Arg Arg Leu

260

265

270

ctg gtg ctg gag gaa ttc aag acg gag aag agg ctg tgc aag atg ttc

864

Leu Val Leu Glu Glu Phe Lys Thr Glu Lys Arg Leu Cys Lys Met Phe

275

280

285

tac gcc atc acg ctg ctc ttc ctg ctc ctc tgg ggg ccc tat gtg gtt

912

Tyr Ala Ile Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Gly Pro Tyr Val Val

290

295

300

gcc agt tac ctg cgc gtc ctg gtg cgg ccc gga gct gtc ccg cag gcc

960

Ala Ser Tyr Leu Arg Val Leu Val Arg Pro Gly Ala Val Pro Gln Ala

305

310

315

320

tac ctg aca gcc tcg gtg tgg ctg aca ttc gca cag gcc ggc atc aac

1008

Tyr Leu Thr Ala Ser Val Trp Leu Thr Phe Ala Gln Ala Gly Ile Asn

325

330

335

ccc gtg gtg tgt ttc ctc ttc aac cgg gag ctg agg gac tgt ttc aga

1056

Pro Val Val Cys Phe Leu Phe Asn Arg Glu Leu Arg Asp Cys Phe Arg

340

345

350

gcc cag ttc ccc tgt tgc cag agc ccc cag gcc acg cag gcc acc ctc

1104

Ala Gln Phe Pro Cys Cys Gln Ser Pro Gln Ala Thr Gln Ala Thr Leu

355

360

365

ccc tgc gac ctg aaa ggc att ggt ttg tga

1134

Pro Cys Asp Leu Lys Gly Ile Gly Leu

370

375

<210> 22

<211> 377

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 22

Met Ala Asn Ala Ser Glu Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Ala

1

5

10

15

Ala Ala Leu Gly Leu Arg Leu Ala Thr Leu Ser Leu Leu Leu Cys Val

20

25

30

Ser Leu Ala Gly Asn Val Leu Phe Ala Leu Leu Ile Val Arg Glu Arg

35

40

45

Ser Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Leu Leu Leu Asp Leu Cys Leu Ala

50

55

60

Asp Gly Leu Arg Ala Leu Ala Cys Leu Pro Ala Val Met Leu Ala Ala

65

70

75

80

Arg Arg Ala Ala Ala Ala Ala Gly Thr Pro Pro Gly Ala Leu Gly Cys

85

90

95

Lys Leu Leu Ala Phe Leu Ala Ala Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe

100

105

110

Leu Leu Leu Gly Val Gly Val Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His

115

120

125

Arg Phe Tyr Ala Glu Arg Leu Ala Gly Trp Pro Cys Ala Ala Met Leu

130

135

140

Val Cys Ala Ala Trp Ala Leu Ala Leu Ala Ala Ala Phe Pro Pro Val

145 150 155 160

Leu Asp Gly Gly Gly Ala Asp Asp Glu Asp Ala Pro Cys Ala Leu Glu

165 170 175

Gln Arg Pro Asp Gly Ala Pro Gly Ala Leu Gly Phe Leu Leu Leu Leu

180 185 190

Ala Ala Val Val Gly Ala Thr His Leu Val Tyr Leu Arg Leu Leu Phe

195 200 205

Phe Ile His Asp Arg Arg Lys Met Arg Pro Ala Arg Leu Val Pro Ala

210 215 220

Val Ser His Asp Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln Ala

225 230 235 240

Ala Ala Asn Trp Thr Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Ala

245 250 255

Leu Val Gly Ile Arg Pro Ala Gly Pro Gly Arg Gly Ala Arg Arg Leu

260

265

270

Leu Val Leu Glu Glu Phe Lys Thr Glu Lys Arg Leu Cys Lys Met Phe

275

280

285

Tyr Ala Ile Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Gly Pro Tyr Val Val

290

295

300

Ala Ser Tyr Leu Arg Val Leu Val Arg Pro Gly Ala Val Pro Gln Ala

305

310

315

320

Tyr Leu Thr Ala Ser Val Trp Leu Thr Phe Ala Gln Ala Gly Ile Asn

325

330

335

Pro Val Val Cys Phe Leu Phe Asn Arg Glu Leu Arg Asp Cys Phe Arg

340

345

350

Ala Gln Phe Pro Cys Cys Gln Ser Pro Gln Ala Thr Gln Ala Thr Leu

355

360

365

Pro Cys Asp Leu Lys Gly Ile Gly Leu

370

375

<210> 23

<211> 1113

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1110)

<223> Rat SREB2

<400> 23

atg gcg aac tat agc cat gca gct gac aac att ttg caa aat ctc tcg

48

Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn Ile Leu Gln Asn Leu Ser

1

5

10

15

cct cta aca gcc ttt ctg aaa ctg act tcc ttg ggt ttc ata ata gga

96

Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe Ile Ile Gly

20

25

30

gtc agt gtg gtg ggc aac ctt ctg atc tcc att ttg cta gtg aaa gat

144

Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu Ile Ser Ile Leu Leu Val Lys Asp

35

40

45

aag acc ttg cat aga gct cct tac tac ttc ctg ctg gat ctg tgc tgc

192

Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys

50

55

60

tca gac atc ctc aga tct gca att tgt ttt cca ttt gta ttc aac tct

240

Ser Asp Ile Leu Arg Ser Ala Ile Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser

65

70

75

80

gtc aaa aat ggc tct acc tgg act tac ggg act ctg act tgc aaa gtg

288

Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val

85

90

95

att gcc ttt ctg ggg gtt ttg tcc tgt ttc cac act gcc ttc atg ctc

336

Ile Ala Phe Leu Gly Val Leu Ser Cys Phe His Thr Ala Phe Met Leu

100

105

110

ttc tgc atc agc gtc acc aga tac tta gcc atc gcc cat cac cgc ttc

384

Phe Cys Ile Ser Val Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His Arg Phe

115

120

125

tat aca aag agg ctg acc ttt tgg acg tgt ttg gct gtg atc tgc atg

432

Tyr Thr Lys Arg Leu Thr Phe Trp Thr Cys Leu Ala Val Ile Cys Met

130

135

140

gtg tgg act ctg tct gtg gcc atg gca ttt ccc cca gtt tta gat gta

480

Val Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Leu Asp Val

145

150

155

160

ggc acc tac tca ttc att agg gag gag gat cag tgt acc ttc caa cac

528

Gly Thr Tyr Ser Phe Ile Arg Glu Glu Asp Gln Cys Thr Phe Gln His

165

170

175

cgc tcc ttc agg gct aac gat tcc cta gga ttt atg ctg ctc ctt gct
576

Arg Ser Phe Arg Ala Asn Asp Ser Leu Gly Phe Met Leu Leu Leu Ala

180

185

190

ctc atc ctc cta gcc aca cag ctt gtc tac ctc aag ctg ata ttt ttt
624

Leu Ile Leu Leu Ala Thr Gln Leu Val Tyr Leu Lys Leu Ile Phe Phe

195

200

205

gtc cac gat cga agg aaa atg aag cca gtc cag ttt gta gca gca gtc
672

Val His Asp Arg Arg Lys Met Lys Pro Val Gln Phe Val Ala Ala Val

210

215

220

agt cag aac tgg acc ttt cat ggc cct gga gct agt ggc cag gca gct
720

Ser Gln Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Ala Ala

225

230

235

240

gcc aat tgg cta gca gga ttt gga agg ggt ccc aca cca ccc acc ttg
768

Ala Asn Trp Leu Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Thr Leu

245

250

255

ctg ggc atc agg caa aat gcg aat acc aca ggc aga aga cgg ctc ttg

816

Leu Gly Ile Arg Gln Asn Ala Asn Thr Thr Gly Arg Arg Arg Leu Leu

260

265

270

gtt ttg gat gag ttc aaa atg gag aaa aga atc agc aga atg ttc tat

864

Val Leu Asp Glu Phe Lys Met Glu Lys Arg Ile Ser Arg Met Phe Tyr

275

280

285

ata atg act ttc ctc ttc cta acc ttg tgg ggt ccc tac ctg gtg gcc

912

Ile Met Thr Phe Leu Phe Leu Thr Leu Trp Gly Pro Tyr Leu Val Ala

290

295

300

tgc tat tgg aga gtt ttt gca aga ggg cct gta gta cca ggg gga ttt

960

Cys Tyr Trp Arg Val Phe Ala Arg Gly Pro Val Val Pro Gly Gly Phe

305

310

315

320

cta aca gcc gct gtc tgg atg agt ttc gcc caa gca gga atc aat ccc

1008

Leu Thr Ala Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Gly Ile Asn Pro

325

330

335

ttt gtc tgc att ttc tcc aac agg gag ctg agg cgc tgt ttc agc aca

1056

Phe Val Cys Ile Phe Ser Asn Arg Glu Leu Arg Arg Cys Phe Ser Thr

340

345

350

acc ctt ctt tac tgc aga aaa tcc agg tta cca agg gaa cct tac tgt

1104

Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Glu Pro Tyr Cys

355

360

365

gtt ata tga

1113

Val Ile

370

<210> 24

<211> 370

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 24

Met Ala Asn Tyr Ser His Ala Ala Asp Asn Ile Leu Gln Asn Leu Ser

1

5

10

15

Pro Leu Thr Ala Phe Leu Lys Leu Thr Ser Leu Gly Phe Ile Ile Gly

20

25

30

Val Ser Val Val Gly Asn Leu Leu Ile Ser Ile Leu Leu Val Lys Asp

35

40

45

Lys Thr Leu His Arg Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu Cys Cys

50

55

60

Ser Asp Ile Leu Arg Ser Ala Ile Cys Phe Pro Phe Val Phe Asn Ser

65

70

75

80

Val Lys Asn Gly Ser Thr Trp Thr Tyr Gly Thr Leu Thr Cys Lys Val

85

90

95

Ile Ala Phe Leu Gly Val Leu Ser Cys Phe His Thr Ala Phe Met Leu

100

105

110

Phe Cys Ile Ser Val Thr Arg Tyr Leu Ala Ile Ala His His Arg Phe

115

120

125

Tyr Thr Lys Arg Leu Thr Phe Trp Thr Cys Leu Ala Val Ile Cys Met

130

135

140

Val Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Leu Asp Val

145

150

155

160

Gly Thr Tyr Ser Phe Ile Arg Glu Glu Asp Gln Cys Thr Phe Gln His

165

170

175

Arg Ser Phe Arg Ala Asn Asp Ser Leu Gly Phe Met Leu Leu Leu Ala

180

185

190

Leu Ile Leu Leu Ala Thr Gln Leu Val Tyr Leu Lys Leu Ile Phe Phe

195

200

205

Val His Asp Arg Arg Lys Met Lys Pro Val Gln Phe Val Ala Ala Val

210

215

220

Ser Gln Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Ser Gly Gln Ala Ala

225 230 235 240

Ala Asn Trp Leu Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Thr Pro Pro Thr Leu

245 250 255

Leu Gly Ile Arg Gln Asn Ala Asn Thr Thr Gly Arg Arg Arg Leu Leu

260 265 270

Val Leu Asp Glu Phe Lys Met Glu Lys Arg Ile Ser Arg Met Phe Tyr

275 280 285

Ile Met Thr Phe Leu Phe Leu Thr Leu Trp Gly Pro Tyr Leu Val Ala

290 295 300

Cys Tyr Trp Arg Val Phe Ala Arg Gly Pro Val Val Pro Gly Gly Phe

305 310 315 320

Leu Thr Ala Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Gly Ile Asn Pro

325 330 335

Phe Val Cys Ile Phe Ser Asn Arg Glu Leu Arg Arg Cys Phe Ser Thr

340

345

350

Thr Leu Leu Tyr Cys Arg Lys Ser Arg Leu Pro Arg Glu Pro Tyr Cys

355

360

365

Val Ile

370

<210> 25

<211> 1122

<212> DNA

<213> Rat coronavirus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1119)

<223> Rat SREB3

<400> 25

atg gcc aac acc acc gga gag ccc gaa gag gtg agc ggc gca ctg tcc

48

Met Ala Asn Thr Thr Gly Glu Pro Glu Glu Val Ser Gly Ala Leu Ser

1

5

10

15

ctg cca tca gca tgc gct tat gtg aag ctg gtg ctg ctg gga ctg atc

96

Leu Pro Ser Ala Ser Ala Tyr Val Lys Leu Val Leu Leu Gly Leu Ile

20

25

30

atg tgt gta agc ctg gca ggc aat gcc atc ttg tcc ctg ctg gtg ctc

144

Met Cys Val Ser Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Ser Leu Leu Val Leu

35

40

45

aag gag cgt gcc ctg cac aag gct cct tac tac ttt ctg ctg gac ctg

192

Lys Glu Arg Ala Leu His Lys Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu

50

55

60

tgc cta gcc gat ggc ata cgc tct gcc atc tgc ttc ccc ttt gta ctg

240

Cys Leu Ala Asp Gly Ile Arg Ser Ala Ile Cys Phe Pro Phe Val Leu

65

70

75

80

gct tct gtg cgc cat ggc tcc tcg tgg acc ttc agt gca ctc agc tgt

288

Ala Ser Val Arg His Gly Ser Ser Trp Thr Phe Ser Ala Leu Ser Cys

85

90

95

aag att gtg gcc ttt atg gct gtg ctc ttt tgc ttc cat gcg gcc ttc

336

Lys Ile Val Ala Phe Met Ala Val Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe

100

105

110

atg ctg ttc tgc atc agc gtc acc cgc tac atg gcc atc gcc cac cac

384

Met Leu Phe Cys Ile Ser Val Thr Arg Tyr Met Ala Ile Ala His His

115

120

125

cgc ttc tat gcc aag cgc atg aca ctc tgg aca tgc gca gct gtc atc

432

Arg Phe Tyr Ala Lys Arg Met Thr Leu Trp Thr Cys Ala Ala Val Ile

130

135

140

tgc atg gcc tgg acc ttg tct gtg gcc atg gct ttc cca cct gtc ttt

480

Cys Met Ala Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Phe

145

150

155

160

gat gtg ggc acc tac aag ttt atc cga gag gag gac cag tgc atc ttt

528

Asp Val Gly Thr Tyr Lys Phe Ile Arg Glu Glu Asp Gln Cys Ile Phe

165

170

175

gag cat cgc tac ttc aaa gca aat gac act ctg ggc ttt atg ctt atg

576

Glu His Arg Tyr Phe Lys Ala Asn Asp Thr Leu Gly Phe Met Leu Met

180

185

190

ttg gct gtg ctc atg gca gcc aca cat gct gtc tat ggc aag ctg cta

624

Leu Ala Val Leu Met Ala Ala Thr His Ala Val Tyr Gly Lys Leu Leu

195

200

205

ctc ttc gag tat cgt cac cgc aag atg aag cca gtg cag atg gtg ccc

672

Leu Phe Glu Tyr Arg His Arg Lys Met Lys Pro Val Gln Met Val Pro

210

215

220

gcc atc agc caa aac tgg aca ttc cat ggc cct ggg gct acc ggc cag

720

Ala Ile Ser Gln Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln

225

230

235

240

gct gct gcc aac tgg atc gct ggc ttt ggc cgt ggg ccc atg cca cca
768

Ala Ala Ala Asn Trp Ile Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Met Pro Pro

245

250

255

act ctg ctg ggt atc cgg cag aat ggg cat gca gct agc cgg cgg cta
816

Thr Leu Leu Gly Ile Arg Gln Asn Gly His Ala Ala Ser Arg Arg Leu

260

265

270

ctg ggc atg gac gag gtc aag ggt gaa aag cag ctg ggc cga atg ttc
864

Leu Gly Met Asp Glu Val Lys Gly Glu Lys Gln Leu Gly Arg Met Phe

275

280

285

tac gcg att aca ctg ctc ttc ctg ctc ctc tgg tca cca tac att gtg
912

Tyr Ala Ile Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Ser Pro Tyr Ile Val

290

295

300

gcc tgc tac tgg cga gtg ttt gtg aaa gcc tgc gct gtg ccc cac cgc
960

Ala Cys Tyr Trp Arg Val Phe Val Lys Ala Cys Ala Val Pro His Arg

305

310

315

320

tac ctg gcc act gct gtt tgg atg agc ttc gcc cag gct gct gtc aac
1008

Tyr Leu Ala Thr Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Ala Val Asn

325

330

335

cca atc gtc tgc ttc ctg ctt aac aag gac ctc aag aag tgc ctg agg
1056

Pro Ile Val Cys Phe Leu Leu Asn Lys Asp Leu Lys Lys Cys Leu Arg

340

345

350

act cat gcc cct tgc tgg ggc aca gga ggt gcc cca gct ccc aga gaa
1104

Thr His Ala Pro Cys Trp Gly Thr Gly Gly Ala Pro Ala Pro Arg Glu

355

360

365

ccc tac tgt gtc atg tga
1122

Pro Tyr Cys Val Met

370

<210> 26

<211> 373

<212> PRT

<213> Rat coronavirus

<400> 26

Met Ala Asn Thr Thr Gly Glu Pro Glu Glu Val Ser Gly Ala Leu Ser

1 5 10 15

Leu Pro Ser Ala Ser Ala Tyr Val Lys Leu Val Leu Leu Gly Leu Ile

20 25 30

Met Cys Val Ser Leu Ala Gly Asn Ala Ile Leu Ser Leu Leu Val Leu

35 40 45

Lys Glu Arg Ala Leu His Lys Ala Pro Tyr Tyr Phe Leu Leu Asp Leu

50 55 60

Cys Leu Ala Asp Gly Ile Arg Ser Ala Ile Cys Phe Pro Phe Val Leu

65 70 75 80

Ala Ser Val Arg His Gly Ser Ser Trp Thr Phe Ser Ala Leu Ser Cys

85

90

95

Lys Ile Val Ala Phe Met Ala Val Leu Phe Cys Phe His Ala Ala Phe

100

105

110

Met Leu Phe Cys Ile Ser Val Thr Arg Tyr Met Ala Ile Ala His His

115

120

125

Arg Phe Tyr Ala Lys Arg Met Thr Leu Trp Thr Cys Ala Ala Val Ile

130

135

140

Cys Met Ala Trp Thr Leu Ser Val Ala Met Ala Phe Pro Pro Val Phe

145

150

155

160

Asp Val Gly Thr Tyr Lys Phe Ile Arg Glu Glu Asp Gln Cys Ile Phe

165

170

175

Glu His Arg Tyr Phe Lys Ala Asn Asp Thr Leu Gly Phe Met Leu Met

180

185

190

Leu Ala Val Leu Met Ala Ala Thr His Ala Val Tyr Gly Lys Leu Leu

195

200

205

Leu Phe Glu Tyr Arg His Arg Lys Met Lys Pro Val Gln Met Val Pro

210

215

220

Ala Ile Ser Gln Asn Trp Thr Phe His Gly Pro Gly Ala Thr Gly Gln

225

230

235

240

Ala Ala Ala Asn Trp Ile Ala Gly Phe Gly Arg Gly Pro Met Pro Pro

245

250

255

Thr Leu Leu Gly Ile Arg Gln Asn Gly His Ala Ala Ser Arg Arg Leu

260

265

270

Leu Gly Met Asp Glu Val Lys Gly Glu Lys Gln Leu Gly Arg Met Phe

275

280

285

Tyr Ala Ile Thr Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Ser Pro Tyr Ile Val

290

295

300

Ala Cys Tyr Trp Arg Val Phe Val Lys Ala Cys Ala Val Pro His Arg

305

310

315

320

Tyr Leu Ala Thr Ala Val Trp Met Ser Phe Ala Gln Ala Ala Val Asn

325

330

335

Pro Ile Val Cys Phe Leu Leu Asn Lys Asp Leu Lys Lys Cys Leu Arg

340

345

350

Thr His Ala Pro Cys Trp Gly Thr Gly Gly Ala Pro Ala Pro Arg Glu

355

360

365

Pro Tyr Cys Val Met

370

【書類名】 図面

【図 1】

```

SR08 1 NANAAGEPFGSGGCEAAALG---LKEATLSLLLVGLAGM 36
SR08 2 MANYSHAADNILONLSE--LTFERLTSLSGLIGVSVVGM 38
SR08 3 NANTTGEPEEVSGALSPPSASRYVRLVLEGLIMCVSLAGH 40

SR08 1 VLFALLIYREESSEHRAFPVFLDEDDCLACGLRALACLFAVM 76
SR08 2 LKISILLVNDKTLHRAFPVFLDLCLCSLILSSAICGFYF 78
SR08 3 AILGLEVLHRAALHKAPVFLDLCLCADRISSAVCFYFYL 80

SR08 1 LAAERAAAAAGAPPGAUGCNLLATLAALSGTHAAFLLLGV 116
SR08 2 NSVKNGSTNY--ETLTCEVIAFLGVLSTHTATHLFGL 115
SR08 3 ASVEREGSSNFF--SALSQNIIVAMAVETTHRAHNLFCI 117

SR08 1 GVTRYLAIAHHFFVAERLAGHPCAMMLVCAAAALALAAAF 156
SR08 2 GVTRYLAIAHHRELTHERLTFNTCLAV-ICHVNTLSVANAF 154
SR08 3 GVTRYMAIAHHREFFAKEMILNHTCAAV-ICHVNTLSVANAF 156

SR08 1 FFVLDGGG---DDEDAPEALEQFPDGAFGALGLLGLAVV 193
SR08 2 FFVLDVGTSTSTIREEDDQCTEQHPSERANESLGFHLLALI 194
SR08 3 FFVFDVGTSTKSTIREEDDQCTETEEHYEKANDTEGFHLLAL 196

SR08 1 VGATHDLVYLRLLEFIHDERRKHREARLVPAVEHDTTFHGP 233
SR08 2 LLATQLVYLNKLIIFVHDERRKHREPVGFVAAMGQNTTFHGP 234
SR08 3 MARTHAHYGELLELEYRHRKHREPVGMVPAISQNTTFHGP 236

SR08 1 ATGQAAANLTAGFGRGPTPHA-VGIRPAPGRGARELLVL 273
SR08 2 ASGQAAANLLAGFGRGPTPTTLGIRQANTTERELLVL 274
SR08 3 ATGQAAANLIAGFGRGPMPTTLGIRQNGHAASRE--GM 275

SR08 1 EEFKTERRLCKHRYAVTLFLFLGLNGPVVVASLRLVLRPG 313
SR08 2 DEEFMEKEISHHFYIMIFLFLGLNGPVLVACYHRYFAAGP 314
SR08 3 DEVRGRHQGLGHHFYAITLFLFLGLNGPVLVACYHRYFAKAC 315

SR08 1 AVFQAAYLTASVHLTFAQAGQHPVVCHEFFUREEDRDCEFAQF 353
SR08 2 VVEGGFLTAAYHNSFAQAGHNFVVCIFSNHEELRCFSTTL 354
SR08 3 AVFHRFLATAVHNSFAQAGAVHFIHCEFLKDKKCLRCHA 355

SR08 1 ECQSPRTTQATHP--DLKGIGL. 376
SR08 2 LYCRKS--RLSEEEYQ-----VI. 371
SR08 3 E-GWGTGCAPRRSEEEYQ-----MM. 374

```


【図 2】

1.4-

2.4-

4.4-

7.5-

9.5-

心臓
脳
胎盤
肺
肝臓
骨格筋
腎臓
脾臓

1.4-

2.4-

4.4-

7.5-

9.5-

脾臓
胸腺
前立腺
精巣
卵巣
小腸
大腸
末梢血白血球

【図 3】

9.5—
7.5—
4.4—
2.4—
1.4—

扁桃体
尾状核
脳梁
海馬
全脳
黒質
視床下核
視床

9.5—
7.5—
4.4—
2.4—
1.4—

小脳
大腦皮質
延髄
脊髓
大腦皮質後頭葉
大腦皮質前頭葉
大腦皮質側頭葉
被殻

【図 4】

1.4-

2.4-

4.4-

7.5-

9.5-

心臟

腦

胎盤

肺

肝臓

骨格筋

腎臓

脾臓

1.4-

2.4-

4.4-

7.5-

9.5-

脾臓

胸腺

前立腺

精巢

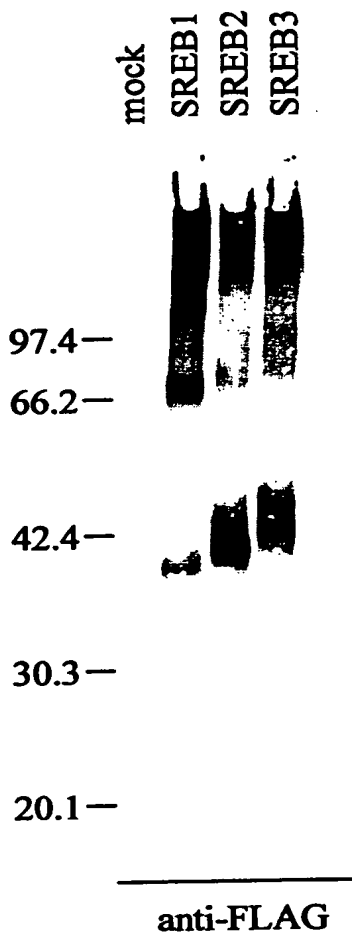
卵巣

小腸

大腸

末梢血白血球

【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明により、中枢神経系に発現している新規なG蛋白質共役型レセプターファミリー蛋白質SREB1、SREB2、SREB3該蛋白質をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の製造方法及び該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を提供する。

【解決手段】 本発明G蛋白質共役型レセプター蛋白質の代表的な取得方法；
本発明G蛋白質共役型レセプター蛋白質の取得には逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応（以下RT-PCRという）を用いる。ヒトまたはラット脳組織あるいは脳由来細胞からmRNAを抽出する。次いでこのmRNAを鋳型として該G蛋白質共役型レセプター蛋白質翻訳領域の全体または一部をはさんだ2種類のプライマーを用い、RT-PCRを行うことにより、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNAまたはその一部を得ることができる。さらに、得られた新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNAまたはその一部を適当な発現ベクターに組み込むことにより、宿主細胞で発現させ、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造することができる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000006677]

1. 変更年月日

1990年 8月10日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋本町2丁目3番11号

氏 名

山之内製薬株式会社